

**Aus der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und
Radioonkologie der Ludwig – Maximilians – Universität
München**

Direktor: Prof. Dr. med. Claus Belka

***In vitro* Untersuchungen zur Wirkung von Photofrin II und
der radioadaptiven Dosis auf HCV29 – und RT4 – Zellen**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig – Maximilians – Universität zu München

vorgelegt von
Alina Balandin

aus
Omsk

2010

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:

Priv. – Doz. Dr. Dr. med. Moshe Schaffer

Mitberichterstatter:

Priv. – Doz. Dr. Patrick J. Bastian

Priv. – Doz. Dr. Sebastian Strieth

Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:

Dr. rer. nat. Ulrike Kulka

Dekan:

Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung:

18.11.2010

Inhaltsverzeichnis

<u>1 EINFÜHRUNG</u>	5
1.1 VORWORT	5
1.2 GRUNDLAGEN DER STRAHLENBIOLOGIE	9
1.3 RADIOSENSITIZER IN DER STRAHLENTHERAPIE – RHOTOFRIN II	17
1.4 WIRKUNG DER RADIOADAPTIVEN DOSIS	22
<u>2 FRAGESTELLUNG</u>	25
<u>3 MATERIAL UND METHODEN</u>	26
3.1 MATERIAL	26
3.1.1 CHEMIKALIEN	26
3.1.2 GERÄTE	27
3.1.3 ZUBEHÖR	28
3.2 METHODEN	29
3.2.1 ZELLINIEN UND ZELLKULTUR	29
3.2.1.1 Verwendete Zelllinien	29
3.2.1.2 Kulturbedingungen	30
3.2.1.3 Versuchsansatz	31
3.2.2 VERWENDUNG DER PHOTOFRIN II – LÖSUNG	34
3.2.3 BESTRAHLUNG UND DOSIMETRIE	36
3.2.3.1 Versuchsaufbau zur Vorbestrahlung	36
3.2.3.2 Versuchsaufbau zur Hauptbestrahlung	37
3.2.4 EXPERIMENTELLER ABLAUF	40
3.2.4.1 Versuchskomplexe	40
3.2.4.2 Versuchsablauf	41
3.2.5 ANALYSE DES ZELLÜBERLEBENS	43
3.2.6 AUSWERTUNG UND STATISTIK	45

<u>4</u>	<u>ERGEBNISSE</u>	<u>46</u>
4.1	VORVERSUCHE	46
4.2	WIRKUNG VON PHOTOFRIN II AUF RT4 – ZELLEN	47
4.2.1	INKUBATION MIT PHOTOFRIN II OHNE BESTRAHLUNG	47
4.2.2	INKUBATION MIT PHOTOFRIN II UND VORBESTRAHLUNG	48
4.2.3	INKUBATION MIT PHOTOFRIN II UND HAUPTBESTRAHLUNG	49
4.2.4	INKUBATION MIT PHOTOFRIN II UND BESTRAHLUNGSKOMBINATIONEN	50
4.2.5	EINFLUSS DER VORBESTRAHLUNG AUF DAS ZELLÜBERLEBEN	52
4.3	WIRKUNG VON PHOTOFRIN II AUF HCV29 – ZELLEN	54
4.3.1	INKUBATION MIT PHOTOFRIN II OHNE BESTRAHLUNG	54
4.3.2	INKUBATION MIT PHOTOFRIN II UND VORBESTRAHLUNG	55
4.3.3	INKUBATION MIT PHOTOFRIN II UND HAUPTBESTRAHLUNG	56
4.3.4	INKUBATION MIT PHOTOFRIN II UND BESTRAHLUNGSKOMBINATIONEN	57
4.3.5	EINFLUSS DER VORBESTRAHLUNG AUF DAS ZELLÜBERLEBEN	59
<u>5</u>	<u>DISKUSSION</u>	<u>61</u>
<u>6</u>	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	<u>71</u>
<u>7</u>	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	<u>74</u>
<u>8</u>	<u>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</u>	<u>87</u>
<u>9</u>	<u>TABELLENVERZEICHNIS</u>	<u>89</u>
<u>10</u>	<u>DANKSAGUNG</u>	<u>91</u>

1 Einführung

1.1 Vorwort

In Deutschland wurde für das Jahr 2006 die Zahl der auftretenden Krebsneuerkrankungen auf 426.800 geschätzt. Dabei entfallen 246.000 Erkrankungen auf Männer und rund 204.000 auf Frauen. Im selben Jahr wurden 210.930 durch Krebserkrankungen verursachte Todesfälle verzeichnet [40].

Als Therapiemöglichkeiten stehen Krebspatienten verschiedene Verfahren wie Chirurgie, Strahlentherapie oder Chemotherapie sowie entsprechende Kombinationen zur Verfügung. Zurzeit werden in Deutschland ca. 60 % aller Tumorpatienten in kurativer oder palliativer Absicht bestrahlt [32].

Die Strahlentherapie befasst sich mit der medizinischen Anwendung ionisierender Strahlen zur Behandlung von gut- und bösartigen Erkrankungen allein oder in Kombination mit chirurgischen oder chemotherapeutischen Maßnahmen. Das Ziel der Strahlentherapie liegt darin, eine maximale Schädigung des Tumorgewebes, bei gleichzeitiger, bestmöglicher Schonung des umliegenden gesunden Gewebes, zu erreichen. Der Erfolg einer Strahlentherapie kann anhand der Wirkung der Bestrahlung auf das Tumorgewebe, den Schäden am Normalgewebe und der Schwere der Nebenwirkungen gemessen werden.

Eine Optimierung der Strahlentherapie kann durch eine interdisziplinäre Tumorbehandlung erreicht werden. Die Kombination aus Radiotherapie und Chirurgie ist z.B. bei fortgeschrittenen Tumoren besonders effektiv. Ein weiteres multimodales Behandlungskonzept ist der zusätzliche Einsatz von chemotherapeutischen Interventionen. Dadurch kann die lokale

Tumorkontrolle erhöht und okkulte Fernmetastasen vernichtet werden.

Eine weitere Möglichkeit, die Effektivität einer Strahlenbehandlung von Krebspatienten zu steigern, besteht in technischen Verbesserungen der Radiotherapie selbst, z.B. durch eine optimierte Einstellung des Zielvolumens für ionisierende Strahlung. Dies kann mit Hilfe einer vorausgehenden medizinischen und physikalischen Planung, einer vorherigen Simulation, durch computergesteuerte Bestrahlungsprotokolle mit verschiedenen Strahlungsarten und Bestrahlungsschemata, sowie durch technische Geräte, wie dem Linearbeschleuniger, der Protonenbestrahlung, der stereotaktischen und bildgesteuerten Strahlentherapie, der intensitätsmodulierten Radiotherapie und dem Cyberknife, erreicht werden [16].

Neben der technischen Optimierung der Bestrahlung besteht auch die Möglichkeit, die Strahlentherapie durch biologische Modifikationen gezielt zu beeinflussen. Biologische Strahleneffekte zeigen sich sowohl bei neoplastischem als auch bei normalem Gewebe und sind von biochemischen und physiologischen Faktoren, wie beispielsweise der Sauerstoffversorgung oder dem Zellzyklus, in den Zellen abhängig [16, 32]. Es gibt verschiedene Möglichkeiten diese Faktoren zu beeinflussen. Dies kann zum einen über chemische Agenzien, wie strahlensensibilisierende oder radioprotektive Substanzen, erfolgen. Zum anderen kann dies durch die Nutzung einer möglichen biologischen Antwort der Zellen auf ionisierende Strahlung, z.B. einer adaptive response [16, 32].

Der Harnblasentumor ist einer der häufigsten Tumore des Beckens mit einer Neuerkrankungsrate von 250.000 Patienten/Jahr weltweit [37]. In Deutschland erkranken jedes Jahr schätzungsweise 27.450 Menschen an einer Tumorerkrankung der Harnblase [40]. Harnblasenkarzinome machen damit etwa 3 % aller bösartigen Tumore aus und treten bei Männern 3 Mal so häufig auf wie bei

Frauen. Erwachsene im 5. – 6. Lebensjahrzehnt sind am häufigsten betroffen. Das mittlere Erkrankungsalter liegt für Männer mit 72 und für Frauen mit 74 Jahren vergleichsweise hoch [40]. Bei bösartigen Neubildungen der Harnblase handelt es sich fast immer um Urothelkarzinome, die auch als maligne Tumore des Übergangsgewebes der ableitenden Harnwege bezeichnet werden und häufig multifokal vorkommen. Seltener sind Plattenepithel- oder Adenokarzinome der Harnblase [71]. Die Prognose bei Harnblasenkrebs variiert stark mit dem Grad der Ausbreitung der Erkrankung zum Zeitpunkt der Diagnose. Die durchschnittliche 5 – Jahres – Überlebensrate liegt für Frauen bei 70 % und für Männer bei 76 %, wenn der Tumor in einem lokal begrenzten Stadium entdeckt wird [40].

Die primäre Therapie des Harnblasenkarzinoms besteht in der chirurgischen Resektion des Tumors. Die weitere Therapie ergibt sich in Abhängigkeit von der Stadieneinteilung und dem Malignitätsgrad des Tumorgewebes.

Mögliche Behandlungsformen sind intravesikale oder systemische Chemotherapie, radikale Zystektomie, präoperative oder kurative Strahlentherapie mit dem Ziel der Organerhaltung. Das normale Harnblasengewebe reagiert auf Bestrahlung sehr empfindlich. Nebenwirkungen zeigen sich als Zystitis, Schrumpfung und Ulzerationen des gesunden Harnblasengewebes. Das Tumorgewebe selbst ist je nach Tumorart unterschiedlich strahlenresistent. Um diese limitierenden Faktoren zu minimieren, werden verschiedene Modulationsmöglichkeiten der Bestrahlung erforscht.

In dieser Arbeit soll anhand von *in vitro* Zellmodellen das Verhalten von Tumor- und Normalgewebe der Harnblase untersucht werden. Dabei liegt der Fokus auf der Frage, ob sich eventuell ergebende gegenläufige Effekte wie eine Erhöhung der Strahlenempfindlichkeit des Tumorgewebes mit Hilfe des Radiosensitizer Photofrin II und

eine Erhöhung der Strahlenresistenz des gesunden Gewebes im Sinne einer radioadaptiven Antwort kombinieren lassen.

Vor diesem Hintergrund wurden HCV29 – Zellen (normales Urothel) und RT4 – Zellen (Harnblasenkarzinomzellen) mit Photofrin II inkubiert und anschließend mit und ohne Vorbestrahlung (0,05 Gy) der üblichen Fraktionsdosis von 2 Gy ausgesetzt. Die Auswirkungen auf das Zellüberleben wurden in Normalzellen und in Tumorzellen gemessen und anschließend verglichen.

Die Fragestellung der vorliegenden Arbeit verfolgt den Zweck, neue Möglichkeiten der Strahlentherapieforschung darzulegen, um dem klinischen Ziel der maximalen Tumorkontrolle bei einer minimalen Schädigung des gesunden Gewebes näher zu kommen.

1.2 Grundlagen der Strahlenbiologie

Die Strahlenbiologie befasst sich mit der Wirkung ionisierender Strahlung auf biologische Objekte. Die klinische Strahlenbiologie konzentriert sich auf die Betrachtung biologischer Effekte bei der Applikation ionisierender Strahlung am Menschen.

Am Anfang der strahlenbiologischen Wirkungskette steht die physikalische Wirkung ionisierender Strahlung. Unabhängig von der Strahlenart kommt es im Anschluss daran zu einer direkten oder indirekten Strahlenwirkung. Bei der direkten Strahlenwirkung erfolgt die Energieabsorption des angeregten Teilchens direkt im Biomolekül, z.B. in der Erbsubstanz, der DNA. Bei der indirekten Strahlenwirkung werden zunächst Radikale gebildet, welche über sekundäre Kettenreaktionen Schäden am biologischen Zielmolekül erzeugen. Biologisch von besonderer Bedeutung ist in diesem indirekten Prozess die Radiolyse des Wassers. Zunächst wird ein Wassermolekül durch Energieabsorption in ein Elektron und ein H_2O^+ – Ion gespalten, dabei nimmt das Elektron Energie auf und verlässt das Wassermolekül. Es folgen weitere Radikalbildungen infolge der Abspaltung des H^+ – Ions [32].

Aus der Radiolyse des Wassers resultieren vor allem oxidierende Hydroxyl – Radikale, reduzierende Wasserstoff – Radikale und Elektronen mit Wasserhülle (e_{aqu}), sogenannte solvatisierte Elektronen. Zusätzlich werden H_2 – Moleküle und Peroxide (H_2O_2) gebildet. Diese zeichnen sich ebenfalls durch eine große biologische Wirksamkeit aus und verstärken somit die Strahlenwirkung. Bei Anwesenheit von Sauerstoff entstehen bevorzugt Hydroxyl – und Peroxyl – Radikale. Diese Radikale können aufgrund ihrer geringen Reaktionsfreudigkeit im Vergleich zu anderen Radikalen über eine längere Strecke diffundieren und auf diese Weise Moleküle über eine größere Distanz hinweg schädigen [16, 32].

Bei der Wirkung ionisierender Strahlung auf lebende Organismen spielt sich eine komplexe Reaktionsfolge ab. Sie lässt sich auf einer Zeitachse in unterschiedliche Phasen einteilen.

In der physikalischen Phase, die 10^{-18} bis 10^{-10} Sekunden dauert, erfolgt die Ionisation und Anregung von Atomen und Molekülen. Die anschließende chemische Phase von 10^{-12} bis 10^{-6} Sekunden umfasst die Reaktion der obigen Produkte mit der Umgebung, sowie die Dissoziation und Bildung von Radikalen. In der biochemischen Phase, 10^{-2} Sekunden, finden die Diffusion von Radikalen und die chemischen Reaktionen mit Biomolekülen statt. Der biochemischen Phase folgt die biologische Phase, welche wenige Sekunden bis mehrere Jahre dauern kann und in der sich die chemischen Veränderungen infolge der Strahlenwirkung auf zellulärer Ebene abspielen. Von besonderer Bedeutung sind dabei Schäden an der Erbsubstanz, der DNA. Wenn die entstandenen DNA – Schäden nicht repariert werden, können stochastische und deterministische Schäden die Folge sein [16].

Die deterministischen Effekte entstehen durch Gewebe- und Organschäden nach strahlenbedingtem übermäßigem Zelltod. Die Art und Schwere der Schädigung ist dabei strikt dosisabhängig, wobei es unterhalb eines Schwellenwertes zu keinen Effekten kommt. Zu den Auswirkungen der deterministischen Schäden gehören alle akuten Strahlenwirkungen, z.B. das Hauterythem, Haarausfall und teratogene Folgen.

Zu den stochastischen Effekten zählt die Karzinogenese, die in überlebenden Zellen durch Mutationen und Zelltransformationen hervorgerufen wird. Die Strahlendosis hat dabei keine Auswirkung auf die Schwere der Erkrankung, sondern nur auf die Häufigkeit des Auftretens (Risiko).

Bei der Strahlentherapie kann es sowohl zu deterministischen als auch zu stochastischen Strahlenschäden kommen. Insbesondere während der klinischen Phase ist mit möglichen Frühreaktionen im

bestrahlten Individuum zu rechnen, wie z.B. mit radiogener Mukositis der Mundschleimhaut, aber auch mit Spätschäden wie Lungenfibrose, Strahlenmyelopathie und strahleninduzierten Tumoren [16].

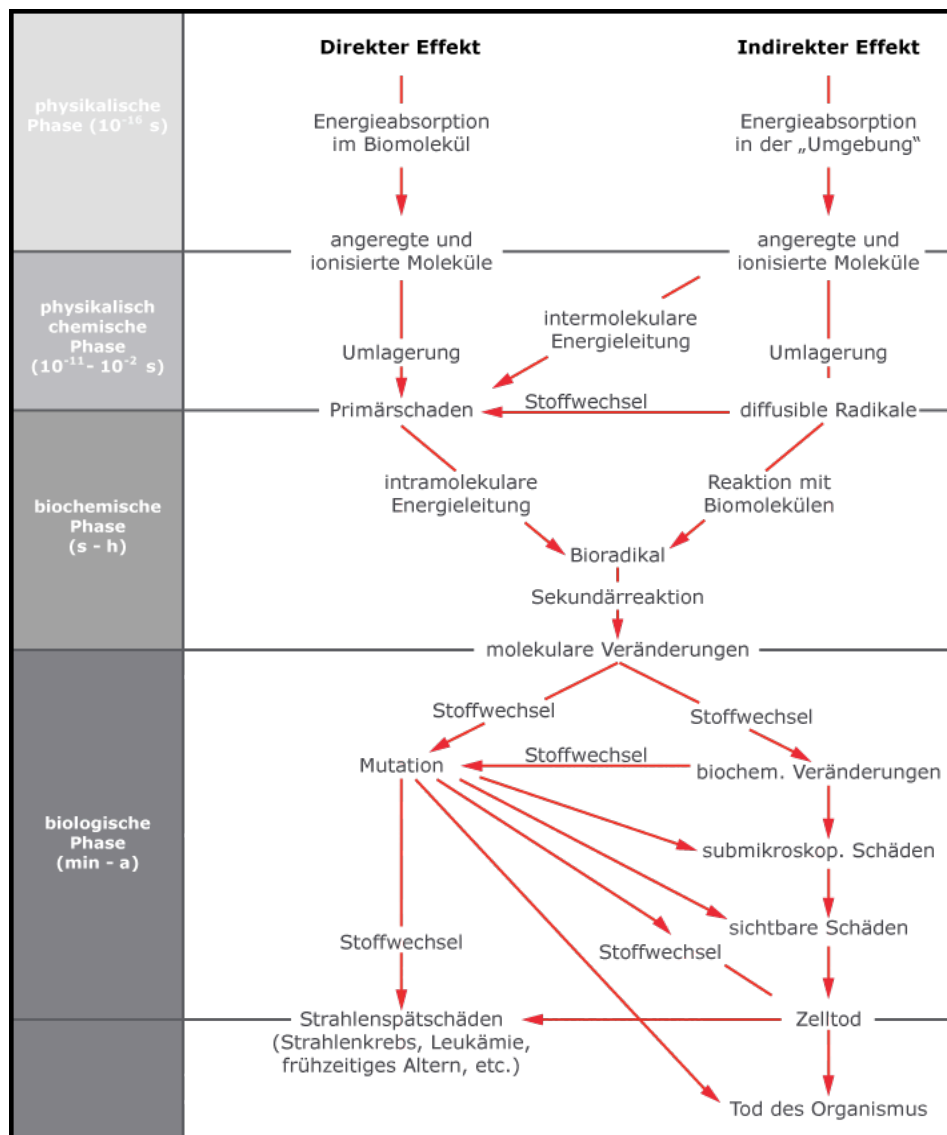


Abbildung 1: Zeitlicher Verlauf der biologischen Strahlenwirkung [27]

Um die Schäden im Normalgewebe zu minimieren, ist die Fraktionierung der Bestrahlungsdosis ein bewährtes Therapiekonzept. Darunter wird die Aufteilung der Gesamtdosis auf mehrere Einzeldosen verstanden. Der Grundgedanke verschiedener Fraktionierungspläne ist die Verabreichung einer optimalen Bestrahlungsdosis, um eine maximal positive Antwort (Tumorvernichtung) bei minimaler Toxizität (Schonung des Normalgewebes) zu gewähren. Dies wird durch den Umstand ermöglicht, dass gesundes Gewebe oftmals subletale Schäden in den Pausen zwischen zwei Bestrahlungssitzungen weitgehend reparieren kann, während das Tumorgewebe dazu meist weniger effizient in der Lage ist [37].

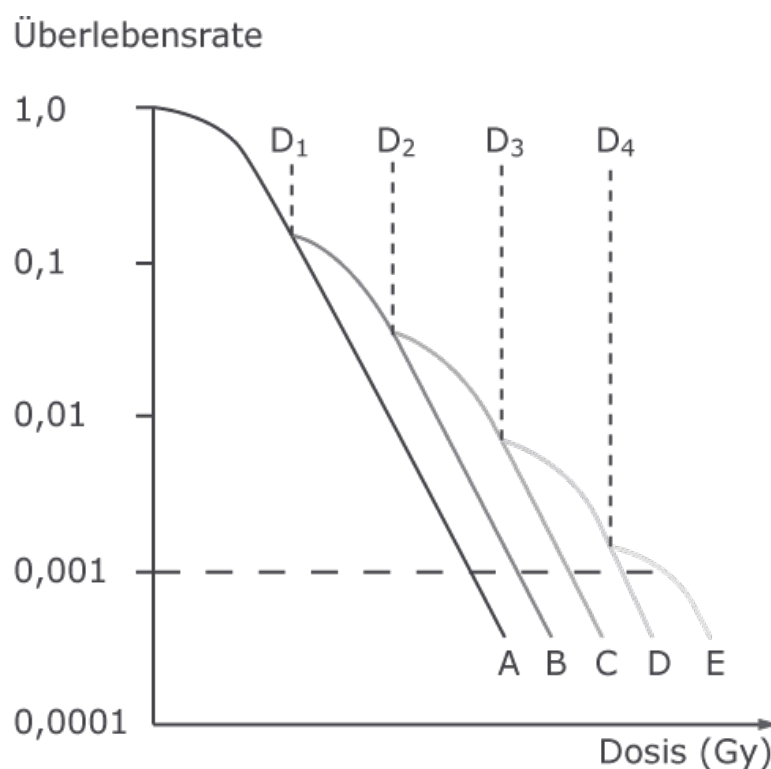


Abbildung 2: Dosis – Effekt – Kurve nach fraktionierter Bestrahlung (D1 – D4) einer Zellkultur. Kurve A entspricht der Überlebenskurve nach einer Einzeldosisbestrahlung, B – E den Überlebenskurven nach fraktionierter Bestrahlung [50]

Die zeitliche Dosisverteilung kann als Standardfraktionierung, Hypofraktionierung, Hyperfraktionierung oder akzelerierte Hyperfraktionierung erfolgen. Dabei ist die Standardfraktionierung das am häufigsten verwendete Bestrahlungsschema.

	ED	GD	Anzahl / Tag	Anzahl / Woche
Standardfraktionierung	2 Gy	60 Gy	1	5
Hypofraktionierung	4 Gy	48 Gy	1	3
Hyperfraktionierung	1 Gy	60 Gy	2	10
akzelerierte Fraktionierung	1,3 Gy / 1,7 Gy	60 Gy	2	10

Tabelle 1: Beispiele für zeitliche Dosisverteilungen bei unterschiedlichen Fraktionierungsarten. Einzeldosis (ED), Gesamtdosis (GD), Anzahl der täglichen und wöchentlichen Bestrahlungen [16]

Die Fraktionierung der therapeutischen Dosis ermöglicht eine optimale Ausnutzung grundlegender physiologischer Mechanismen des Gewebes als Reaktion auf die Strahlenwirkung, welche durch die „4 R's“ der Strahlenbiologie beschrieben werden [32].

Diese umfassen die Reparatur subletaler Strahlenschäden in den Zellen, die Reoxygenierung der Zellen, die Redistribution (Neuverteilung) der Zellen innerhalb des Zellzyklus und die Repopulation (Regeneration) von Zellen im Gewebe.

Die Vorteile dieser strahlenbiologischen Effekte ergeben sich wie im Folgenden beschrieben:

Durch die Verteilung der Gesamtdosis auf mehrere Einzeldosen wird den Zellen immer wieder die Gelegenheit zur Reparatur subletaler Strahlenschäden oder partiell letaler Schäden gegeben. Dies gilt im niedrigen Dosisbereich und hier besonders für Zellen des Normalgewebes.

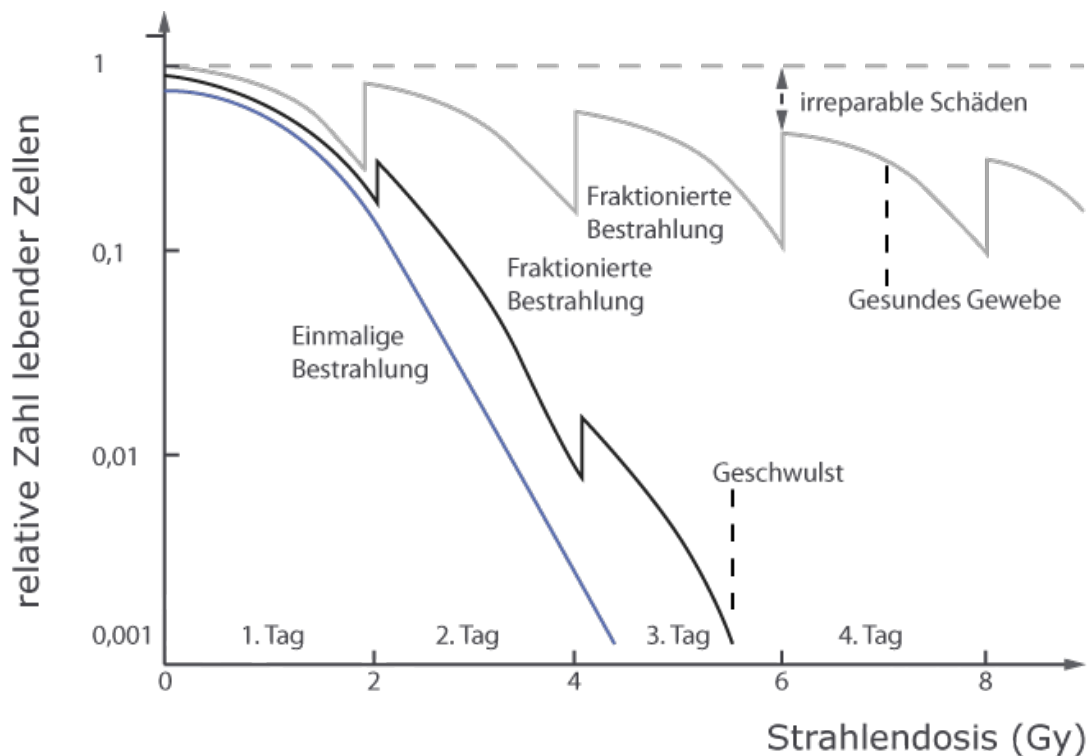


Abbildung 3: Prinzip der Dosisfraktionierung [50]

Ein weiterer Vorteil der Fraktionierung liegt in der Reoxygenierung der Tumorzellen. In Anwesenheit von Sauerstoff reagieren Zellen aufgrund von biochemischen Prozessen empfindlicher auf Strahlung. Da Tumorgewebe in der Regel schlechter als normales Gewebe durchblutet ist, besitzen dessen Zellen einen geringeren Sauerstoffgehalt. Das Ergebnis sind anoxische oder hypoxische Tumorzellen, die somit strahlenunempfindlicher reagieren. Mit zunehmender Anzahl von Fraktionen nimmt der Anteil gut mit Sauerstoff versorgter Zellen durch die Schrumpfung des Tumorgewebes zu, wodurch es wieder strahlenempfindlicher wird. Dieser Reoxygenierungsprozess entsteht durch verschiedene Mechanismen, z.B. durch Öffnung temporär verschlossener Gefäße, durch Verbesserung der Mikrozirkulation bei sinkendem Tumorgewebsdruck sowie durch Verringerung der Interkapillardistanz bei Tumorschrumpfung.

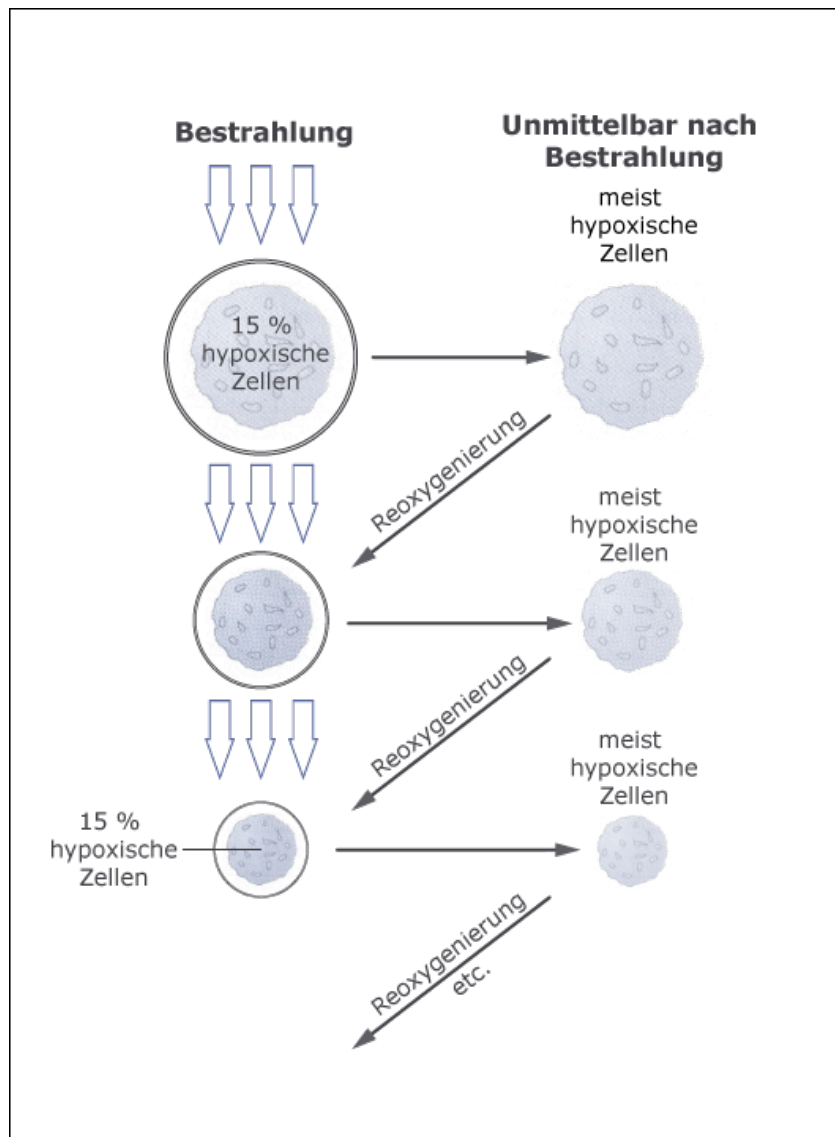


Abbildung 4: Prozess der Reoxygenierung [50]

Die Strahlenempfindlichkeit von Zellen verändert sich ebenfalls in Abhängigkeit von ihrer Phase im Zellzyklus. Der Zellzyklus umfasst die Teilungsphase (Mitose, M – Phase) und die Intermitosephase (Vorbereitung auf die Zellteilung). Der Intermitosezyklus ist sehr komplex. Er gliedert sich in die G_1 – Phase, die S – Phase (DNA Synthese) und die G_2 – Phase. Zellen, die ruhen beziehungsweise nicht proliferieren, bilden die G_0 – Phase. In der Mitose- und der G_2 – Phase sind die Zellen am strahlenempfindlichsten, in der S – Phase und der G_0 - Phase sind die Zellen am strahlenresistentesten [50].

Bei fraktionierter Bestrahlung werden vor allem Zellen in den empfindlichen Zellzyklusphasen abgetötet, während Zellen in resistenteren Phasen eine höhere Überlebenschance haben. Durch diesen Effekt entsteht in einer sich asynchron teilenden Zellpopulation nach einer Bestrahlung eine partielle Synchronisation der Zellen hinsichtlich ihrer Zellzyklusverteilung. Im Fraktionsintervall kommt es dann zu einer Neuverteilung der Zellen auf alle Phasen des Zellzyklus. Dieses Phänomen wird als Redistribution bezeichnet.

In den Bestrahlungspausen kann sich das bestrahlte Gewebe durch Zellteilung wieder regenerieren. Die Repopulierung von Zellen ist daher besonders bedeutsam für das gesunde Gewebe, da hierdurch Frühnebenwirkungen einer Strahlentherapie (deterministische Schäden) verringert werden können [16, 32].

Zusammenfassend ist Zellreparatur und Repopulierung besonders für die Schonung des Normalgewebes von Bedeutung, während durch Reoxygenierung und Redistribution hauptsächlich der gewünschte Strahlenschaden am Tumorgewebe verstärkt wird.

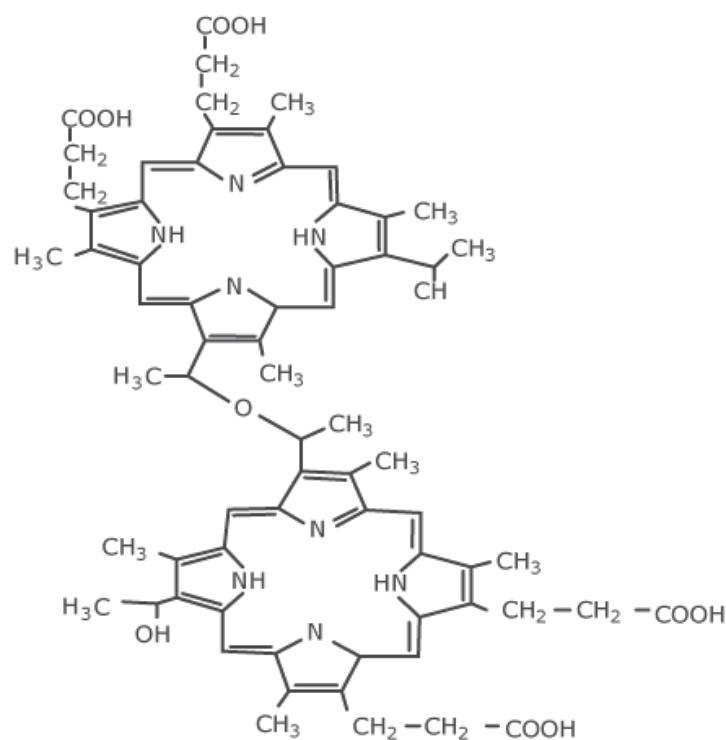
1.3 Radiosensitizer in der Strahlentherapie – Photofrin II

Das Ziel der kurativen Strahlentherapie besteht in der größtmöglichen lokalen Tumorvernichtung unter maximaler Schonung von gesundem Gewebe. Die Wirksamkeit einer Strahlentherapie kann durch Applikation von chemischen und biologischen Substanzen verstärkt oder modifiziert werden.

Der therapeutische Nutzen solcher Modulatoren hängt von den biologischen Eigenschaften der Tumorzellen und der umliegenden Normalzellen ab. Zu berücksichtigen sind dabei vor allem die Sauerstoffversorgung und die Zellzyklusphasenverteilung. Diese Faktoren können durch Chemikalien, die eine radioprotektive oder strahlensensibilisierende Wirkung haben, sowie durch chemotherapeutische Agenzien modifiziert werden [16, 80]. All diese Optimierungsversuche zielen darauf hin, einen maximalen Effekt am Tumorgewebe zu erreichen und dabei die Schäden am Normalgewebe so gering wie möglich zu halten.

Die Photodynamische Therapie (PDT) ist eine Form der Behandlung, die auf dem gleichzeitigen Einsatz von Licht, Sauerstoff und einem Photosensitizer für das jeweilige Zielgewebe basiert. Die PDT wird in der kurativen Behandlung von Präkanzerosen und oberflächlichen Tumoren sowie in der palliativen Tumorthherapie angewendet [20]. Dabei wird zuerst eine photosensitive Substanz, welche sich bevorzugt im Tumorgewebe anreichert, intravenös appliziert. Anschließend wird das neoplastische Gewebe mit einer Wellenlänge, die spezifisch von dem verwendeten Photosensitizer absorbiert wird, behandelt [28]. Zu den meist verwendeten Photosensibilisatoren gehören die Porphyrine, die hauptsächlich in Form von Hämatoporphyrinen und ihren Derivaten eingesetzt werden. Porphyrine beinhalten einen Tetrapyrrolring und besitzen

Photofrin II ist ein häufig verwendeter Photosensibilisator. Dabei handelt es sich um ein heterogenes Gemisch, welches aus Hämatoporphyrin gewonnen wird und sich selektiv im Tumorgewebe anreichert [58].



Aufgrund von guten Ergebnissen mit Photofrin II in der Photodynamischen Therapie und der Selektivität von Porphyrinen für Tumorgewebe wurde untersucht, ob sich diese auch als Radiosensitizer eignen.

18

einer Mischung aus Schwefel- und Essigsäure, auf Tumorzellen nachweisen. Außerdem zeigten sie die bevorzugte Anreicherung von HpD im Tumorgewebe [Schwartz et al., 11].

Für die purifizierte Form des HpD, das Photofrin II, konnte in vergangenen Versuchen die Wirksamkeit als spezifisches und selektives radiosensitivierendes Agens gezeigt werden [28, 51, 52, 53, 54, 55]. In *in vivo* Experimenten wurde demonstriert, dass unter Anwendung von Photofrin II, zusätzlich zur Radiotherapie, eine Erhöhung der Tumorverdopplungszeit erreicht werden konnte und dass Photofrin II nicht nur ein aktiver, sondern auch ein selektiver Radiosensitizer ist [51].

Um die Effizienz der strahlensensibilisierenden Wirkung von Photofrin II im Vergleich zu anderen Porphyrinen zu untersuchen, wurden zusätzliche Versuche mit Photofrin II, Hämatoporphyrin, Zn(II) – Phthalocyanin – Tetrasulfonat (ZnTPS), Chlorin e₆, Zn(II) – Phthalocyanin (ZnPc), 5 – Aminolevulinsäure (5 – ALA) und Protoporphyrin IX durchgeführt [55]. Die Ergebnisse belegen, dass andere tetrapyrrolische Analoga von Porphyrinen, wie Chlorin e₆ und Phthalocyanin, als strahlensensibilisierende Substanzen im wesentlichen ineffektiv sind, obwohl sie sich alle in detektierbaren Mengen in den experimentellen Tumoren angereichert hatten.

Die Versuchsreihen von Kulka et al. konnten reproduzierbar belegen, dass bei Anwendung von Photofrin II als Radiosensitizer an zwei Zelllinien das Zellüberleben von Tumorzellen signifikant erniedrigt werden konnte [28]. Zeigen konnten sie dies an RT4 – Zellen (Harnblasenkarzinom) und U373 MG – Zellen (Glioblastom), welche *in vivo* als strahlenresistent bekannt sind [1, 19]. Dieser strahlensensibilisierende Effekt konnte an HT29 – Zellen (Adenokarzinomzellen des Kolons) nicht beobachtet werden [28].

Weiterhin konnten Schaffer et al. die Wirkung von Photofrin II als selektive und strahlensensibilisierende Substanz in Ösophagus – Plattenepithelkarzinom – Zellen (OE21 – Zellen) belegen [57]. Dieser Effekt konnte jedoch nicht in Ösophagus – Adenokarzinom – Zellen (OE33 – Zellen) beobachtet werden [57].

Weitere Experimente *in vivo* konnten durch Applikation von Photofrin II bei einer Radiotherapie nicht nur in humanen Blasenkarzinomzellen (RT4), sondern auch an Lewis – Sarkomen eine Verzögerung des Tumorwachstums aufzeigen [51, 52, 54, 55].

Bei einer ersten klinischen Applikation von Photofrin II bei Patienten mit Harnblasenkarzinom wurde in zwei Fällen eine Reduktion des Tumorumfanges erzielt, wenn die Substanz 24 Stunden vor der Bestrahlung verabreicht wurde [54]. Eine weitere Studie zur klinischen Anwendbarkeit von Photofrin II zeigte, dass bei 4 von 12 Patienten mit unterschiedlichen Tumoren eine komplette Remission auftrat und bei weiteren 4 Patienten eine Reduktion des Tumorumfanges von 35 % – 45 % erreicht werden konnte. Schwerwiegende Nebenwirkungen wurden nicht beobachtet. Es traten jedoch leichte Diarrhö, Übelkeit und Hautreaktionen auf [59], die als allgemeine Reaktionen auf die Strahlentherapie zurückzuführen sind.

Die Mechanismen, welche für die strahlensensibilisierende Wirkung von Photofrin II verantwortlich sind, konnten noch nicht ausreichend geklärt werden. Bisher gesammelte Daten unterstützen die Hypothese, dass in die radiosensibilisierende Wirkung von Photofrin II Hydroxyl – Radikale, die als Primärprodukt bei der Reaktion aus Röntgenstrahlen und Wasser entstehen, involviert sind [32].

Weiterhin könnten durch Beeinträchtigung der Reparaturprozesse strahleninduzierte Zellschäden nicht mehr effektiv behoben werden [51, 52, 53, 54, 55, 56, 58]. Zudem wird angenommen, dass die oligomeren Porphyrinkomponenten, die in Photofrin II angereichert sind, an dem Prozess der Strahlensensibilisierung beteiligt sind [51, 52, 53, 55, 56, 58].

Porphyrine werden bei einer Wellenlänge zwischen 350 – 800 nm aktiviert, während ionisierende Strahlung eine Wellenlänge zwischen 6×10^{-3} bis 8×10^{-3} nm erzeugt. Durch das unterschiedliche Wellenlängenspektrum ist die strahlensensibilisierende Wirkung durch eine direkte Interaktion zwischen Porphyrinen und der Strahlung als eher unwahrscheinlich zu sehen.

1.4 Wirkung der radioadaptiven Dosis

Die adaptive Antwort (adaptive response, AR) auf ionisierende Strahlung wird durch die Vorbehandlung mit einer sehr niedrigen Strahlendosis hervorgerufen. Sie zeigt sich in einer induzierten verminderten Strahlenreaktion der Zellen im Vergleich zu den schädlichen Effekten einer Hochdosisbestrahlung. Die AR benötigt zu einer Niedrigdosisbestrahlung immer noch zusätzlich eine höhere Bestrahlungsdosis, um ihre Wirkung zu entfalten [22].

Die adaptive Antwort für alkylierende Substanzen wurde zuerst durch Samson und Cairns im Jahre 1977 für *Escherichia coli* und 1980 von Samson und Schwartz für Ovarzellen und Hautfibroblasten des Chinesischen Hamsters beschrieben. Die Beobachtungen ergaben ein gesteigertes Zellüberleben und eine gesenkte Mutationsrate nach Vorbehandlung mit der untersuchten Substanz. Alkylierende Substanzen induzieren eine effizientere Form der DNA – Reparatur von Schäden [46, 47]. Olivieri et al. bemerkten 1984, dass in humanen Lymphozyten nach Vorbehandlung mit dem β – Strahler [^3H] Thymidin nach Bestrahlung weniger Chromosomenaberrationen nachweisbar waren als ohne diese Vorbehandlung [35].

Experimentellen Beobachtungen zur Folge wird die adaptive Antwort bei Vorbestrahlungsdosen von 0,005 Gy – 0,5 Gy induziert [2, 7, 48, 65, 69]. Dagegen kann durch eine zweite Vorbestrahlung im selben Zellzyklus keine zusätzliche Steigerung der Schutzwirkung erreicht werden [2, 18]. Die Dosisrate [13, 42, 68, 79] sowie die Einhaltung der Zeitspanne von 4 – 6 Stunden sind für die Entfaltung der AR entscheidend [21, 65, 66, 69, 78]. Erst nach dieser Zeit tritt der schützende Effekt der AR gegenüber der Wirkung einer großen Folgedosis ein und persistiert für mindestens drei Zellzyklen [66].

Während dieses Stadiums werden mit einer niedrigen Strahlendosis vorbehandelte Zellen vor Chromosomenaberrationen, Mutationen, neoplastischen Transformationen und dem Zelltod durch die Folgedosis partiell geschützt [17, 76, 77, 79].

Ein essentieller Mechanismus im Prozess der intrazellulären adaptiven Antwort sind die Induktion oder Suppression verschiedener Gene, wobei das Protein p53 eine zentrale Position einnimmt. Darüber werden im Folgenden DNA – Reparatur Prozesse, Stressantwort, Zellzykluskontrolle und Apoptose kontrolliert [12, 36, 39, 41]. Weitere wichtige Vorgänge sind die Synthese von Proteinen [6, 44, 78, 87], wie beispielsweise Proteinkinase C, p38 – mitogenaktivierte Proteinkinase (MAP), und Phospholipase C, die in verschiedene Signaltransduktionsketten [49, 73, 76, 82] involviert sind. Ferner ist die adaptive Antwort auch von individuellen genetischen Faktoren abhängig [2, 3, 7, 63]. Eine adaptive Antwort konnte in *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen bei verschiedenen Zelllinien und Spezies [9, 83] unter Verwendung verschiedener Indikatoren für zelluläre Schäden, wie Zellletalität, Chromosomenaberrationen, Induktion von Mutationen, Radiosensitivität und DNA – Reparatur [10, 14, 23, 76, 85] dokumentiert werden [menschliche Lymphozyten (Shadley/Wolff 1987; Cai/Liu 1990); Kaninchen Lymphozyten (Cai/Liu 1990); kultivierte chinesische Hamsterzellen (V79 Zellen, Ikushima 1987/1989); Maus Splenozyten (Wojcik 1991); Knochenmarkszellen (Cai/Liu 1990); pflanzliche Zellen (Cortes 1990)].

Es konnte belegt werden, dass eine adaptive Antwort durch verschiedene schädigende Agenzien, wie alkylierende Substanzen, Hyperthermie, oxidativen Stress, Schwermetalle und ionisierende Strahlung hervorgerufen werden kann [2, 15, 18, 48, 67, 72]. Die adaptive Antwort zeigt eine große Variabilität zwischen

verschiedenen Zelllinien [21, 25, 38, 76, 72] und es scheint, dass sie in Tumorzellen nicht induziert werden kann [24, 25, 33].

Zusammenfassend konnte für ionisierende Strahlen beobachtet werden, dass für die Initialisierung einer adaptiven Antwort eine bestimmte minimale Dosis benötigt wird, die innerhalb eines bestimmten Zeitfensters verabreicht werden muss [66].

Die adaptive Antwort ist zusätzlich von der Dosisrate [68], von genetischen Faktoren [3, 79, 85] sowie den weiteren experimentellen Bedingungen [7] abhängig.

2 Fragestellung

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden folgende Fragestellungen untersucht:

1. Welchen Effekt hat eine Kombination aus Inkubation mit Photofrin II, Vorbestrahlung mit 0,05 Gy und anschließender Hauptbestrahlung mit 2 Gy auf das Überleben von RT4 – Zellen (Harnblasenkarzinomzellen)?
2. Welche Auswirkungen hat die Kombination aus Inkubation mit Photofrin II, Vorbestrahlung mit 0,05 Gy und anschließender Hauptbestrahlung mit 2 Gy auf das Überleben von HCV29 – Zellen (normale Urothelzellen)?
3. Lässt sich anhand der Resultate ein Unterschied im Zellüberleben zwischen den beiden verwendeten Zelllinien nach gleicher kombinatorischer Behandlung erkennen? Wie fällt dieser Unterschied aus?
4. Welche Schlussfolgerungen können aus den Ergebnissen der Experimente gezogen werden? Können diese zur Optimierung des Strahlentherapiekonzeptes des Harnblasenkarzinoms herangezogen werden?

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

GIBCO Invitrogen Corporation, Paisley, Schottland:

- Trypsin – EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)
- PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline), ohne Kalzium, Magnesium und Natriumbicarbonat
- Fötales Kälberserum, auf Mykoplasmen und Viren getestet, hitzeinaktiviert
- MEM (Minimum Essential Medium) mit Earle's Salzen, 25 mM Hydroxyethylpiperazinethansulfonsäure HEPES ohne L – Glutamin
- RPMI 1640 Medium (Rosewell Park Memorial Institute) GLUTAMAX – I
- Penicillin – Streptomycin – Lösung: 104 IU Penicillin/ml und 104 µg Streptomycin/ml

SIGMA-ALDRICH, Taufkirchen:

- Natriumpyruvat 100 mM, Produktnummer S8636

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany:

- Cell Proliferation Reagent WST - 1 – 1

Axcan Pharma International BV, Sittard, Niederlande:

- Photofrin II 75, Wirkstoff: Porfimer – Natrium

3.1.2 Geräte

Philips, Hamburg:

- Röntgen – Bestrahlungsgerät Müller RT 250

Heraeus; Hanau:

- CO2 – Brutschrank Cytoperm 8080
- Sterile Werkbank Laminair

Physikalisch – Technische Werkstätten Pychlau, Freiburg:

- Dosimeter, Dosimentor

Zeiss, Jena:

- Inverses Durchlichtmikroskop, Telaval 31

Eppendorf, Hamburg:

- Pipette Eppendorf Reference 200 – 1000 µl
- Pipette Eppendorf Research 20 – 200 µl

Hirschmann, Eberstadt:

- Pipettomat pipetus akku

Medax, Kiel:

- Wärmeplatte 12800

Physikwerkstatt der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie,
Klinikum Großhadern, München:

- Eigenkonstruktion Plexiglaskammer (mit warmem Wasser durchflutet) als Auflage für 96 – well – plates während der Bestrahlung

3.1.3 Zubehör

Brand, Wertheim:

- Erlenmeyerkolben, verschiedene Größen

Assistent, Sondheim:

- Haemocytometer Deckgläser, 20x26 mm
- Zählkammer Neubauer improved

NUNC, Wiesbaden:

- Multischalen Nunclon, 96 Kammern, rechteckig
- Zellkulturflaschen mit Filterkappe Nunclon, steril, 25 cm²
- Zentrifugenröhrchen, steril, 11 ml
- Zentrifugenröhrchen, steril, 50 ml

Brand, Wertheim:

- Pasteurpipetten aus Glas, ca. 150 mm

Corning Incorporated, New York:

- Pipetten Costar Stripette, steril, 2, 5, 10, 25 ml

Eppendorf, Hamburg:

- Pipettenspitzen Eppendorf Standard gelb, 100 µl

Sarstedt, Nürnberg:

- Pipettenspitzen Sarstedt blau, 1000 µl

Merck, Darmstadt:

- Pipettierbirne, 28 ml

3.2 Methoden

3.2.1 Zelllinien und Zellkultur

3.2.1.1 Verwendete Zelllinien

Die Versuche wurden an gesunden Blasenepithelzellen (HCV29) und an Harnblasenkarzinomzellen (RT4), welche etablierte menschliche Zelllinien sind, durchgeführt.

Die RT4 – Zellen sind eine etablierte Zellkulturlinie [30]. Sie leiten sich von einem Rezidivtumor der Harnblase im klinischen Stadium T2 ab und stammen von einem männlichen Patienten, der bereits 2 Jahre zuvor mit 198 Gold – Kügelchen behandelt wurde. Histologisch handelt es sich um ein differenziertes, papilläres, sehr strahlenresistentes Harnblasenkarzinom [19]. Die RT4 – Zellen bilden in Kultur kleine, kompakte, mehrschichtig wachsende, adhärente Kolonien.

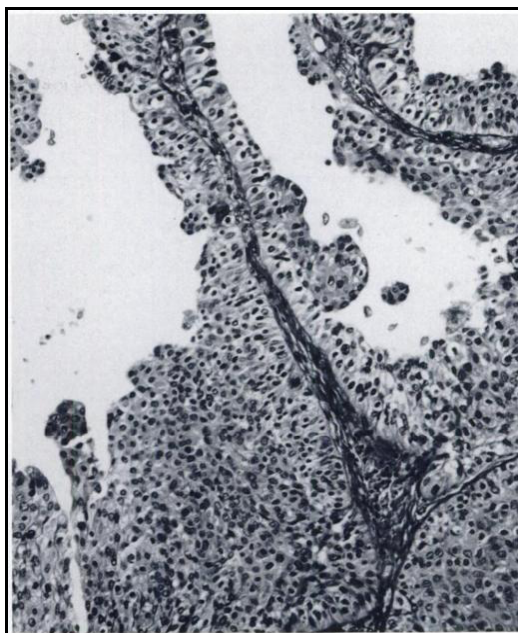


Abbildung 6: Originaltumorzellen des Harnblasenkarzinoms [30]

Bei der HCV29 – Kultur handelt es sich um ein verändertes, nicht maligne entartetes Blasenepithel ohne blasentumorspezifisches Antigen. Es wurde einem Patienten mit Harnblasenkarzinom entnommen [4, 30].

In Kultur wachsen die HCV29 – Zellen als adhärenter einschichtiger Zellrasen.

Die RT4 – und HCV29 – Zelllinien wurden ausgewählt, weil sie ein gutes Beispiel für korrespondierende Zellen in einem *in vitro* Modell darstellen. Dadurch kommt dieses dem realen Fall eines Patienten mit Harnblasenkarzinom, bei dem sowohl tumorös veränderte als auch gesunde Urothelzellen bestrahlt werden, nahe.

Mit den folgenden Versuchen sollte analysiert werden, ob sich durch die Kombination von Photofrin II mit einer adaptiven Strahlendosis eine Therapieoption ergeben könnte, die eine effektivere Tumorbestrahlung bei gleichzeitiger Schonung des gesunden Gewebes erlaubt.

3.2.1.2 Kulturbedingungen

Die RT4 – und HCV29 – Zellen wurden in sterilen Zellkulturflaschen angezüchtet. Für optimale Wachstumsbedingungen wurden die Kulturflaschen mit 18 ml Kulturmedium befüllt. Das Kulturmedium wurde nach Bedarf frisch angesetzt und setzte sich für beide Zelllinien nach folgendem Schema zusammen:

87 % chemisch definiertes RPMI 1640 Medium mit Glutamax

10 % Fötales Kälberserum

1 % Natriumpyruvat, 100 mM

- 1 % Minimum Essential Medium MEM (Eagle), mit Earle`s Salzen, 25 mM HEPES, ohne L – Glutamin
- 1 % Penicillin–Streptomycin, 104 IU Penicillin/ml und 104 µg Streptomycin/ml

Um das Infektionsrisiko der Zellkulturen mit Bakterien zu reduzieren, wurde das Kulturmedium mit einer Antibiotika – Lösung versetzt.

Die Inkubation der Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37°C, 5 % CO₂ – Sättigung und 95 % Luftfeuchtigkeit.

3.2.1.3 Versuchsansatz

Um die optimalen Wachstumsbedingungen für die Weiterzucht der Zelllinien aufrecht zu erhalten, wurden die Zellen ein bis zweimal wöchentlich umgesetzt.

Unter einer sterilen Werkbank wurde zunächst das alte Nährmedium abgesaugt und verworfen. Anschließend erfolgte das Spülen des Zellrasens mit 5 ml PBS Lösung, welche nach kurzem Schwenken wieder abgenommen und entsorgt wurde. Zur enzymatischen Ablösung der Zellen wurden 1,8 ml verdünnter Trypsin – Lösung (10 % Trypsin, 90 % PBS) auf die Zellen gegeben. Während der Einwirkzeit von 5 Minuten wurde die Kulturflasche bei 37°C auf einer Wärmeplatte aufbewahrt. Die Zugabe von 8 ml Kulturmedium neutralisierte die chemische Wirkung des Trypsins und die Zellen konnten durch vorsichtiges Pipettieren vereinzelt werden.

Von dieser resultierenden Zellsuspension wurde ein Teil in eine neue mit 18 ml Nährmedium gefüllte Kulturflasche gegeben. Das

entnommene Zellsuspensionsvolumen richtete sich dabei nach der gewünschten Bewachungsdichte in der zu beimpfenden Kulturflasche.

Für einen optimalen Wachstumsprozess erfolgte die Aufbewahrung der Kulturflaschen weiterhin im Brutschrank.

Um die Umgebungsbedingungen für die Zellen während der Passage weitgehend konstant zu halten, wurden alle verwendeten Chemikalien vorher im Wärmebad auf 37°C erhitzt.

Die Zellen wurden maximal 10 Mal passagiert, anschließend wurden sie verworfen und eine neue Zellcharge aufgetaut.

Für das Ansetzen eines Versuches wurde zuerst die Zellzahl bestimmt. Dafür wurden 2 Tropfen der oben gewonnenen Zellsuspension auf eine Neubauer – Zählkammer gegeben. Im Mikroskop wurden die Zellen in 2x4 Zählfeldern ausgezählt und der Mittelwert errechnet.

In Vorversuchen hatte sich eine Zellzahl von 500 Zellen in 100 µl Medium pro Kammer als optimale Zellkonzentration ergeben.

Die Kombinationsversuche wurden in 96 – well – plates (Schalen mit je 96 Kammern) durchgeführt.

Der äußere Rand der 96 – well – plates wurde mit 200 µl PBS pro Kammer aufgefüllt, um eine homogene Wachstumsatmosphäre zu ermöglichen und Irritationen während der späteren Messung zu vermeiden. In die übrigen Kammern wurden je 100 µl der Versuchszellsuspension gegeben.

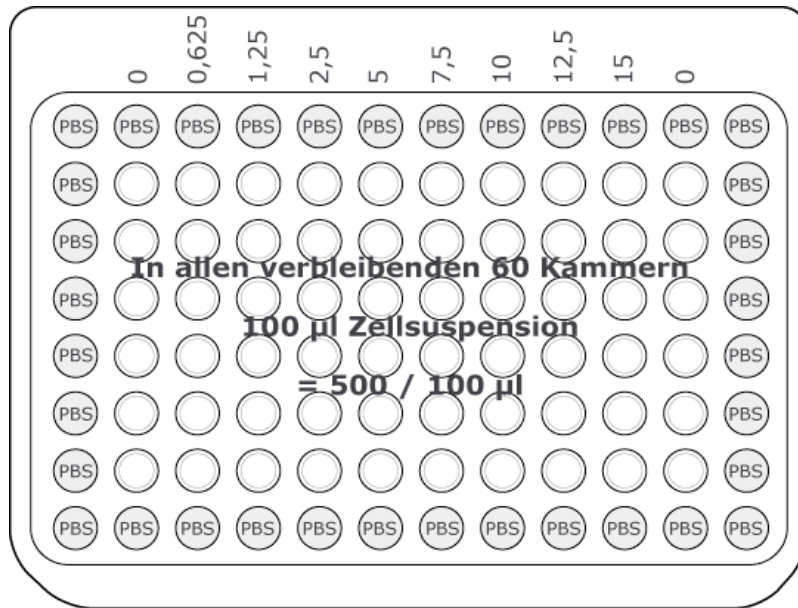


Abbildung 7: Beschriftung und Verteilung der Versuchslösungen auf eine 96 – well – plate

Nach erfolgreichem Ansatz wurden die Kulturschalen in einer lichtgeschützten feuchten Kammer für 24 Stunden im Brutschrank aufbewahrt.

Zusätzlich wurde parallel eine Standardschale mit nur einer Zellsuspension angesetzt, um Rückschlüsse auf die logarithmische Wachstumsphase der Zellen ziehen zu können. Dies dient der Gewährleistung, dass die Messungen in einem Stadium erfolgen, in dem sich die Zellen noch in der Wachstumsphase befinden. Die Standardschale wurde zusammen mit den Versuchsschalen inkubiert, damit die Zellen identischen Versuchsbedingungen ausgesetzt waren.

Die statistische Auswertung der Versuchsdaten erfolgte mittels eines zweiseitigen Students – t – Tests für unabhängige Stichproben.

3.2.2 Verwendung der Photofrin II – Lösung

Sämtliche Arbeitsschritte sowie die anschließenden Experimente wurden unter sterilen Bedingungen und vor direktem Licht geschützt durchgeführt.

Photofrin II wurde als gefriergetrocknetes Porfimer bezogen. Vor der Anwendung wurde das Pulver in 5%iger Glucoselösung auf eine Konzentration von 2,5 mg/ml gelöst. Diese Stammlösung wurde anschließend in 400 µl Portionen in Kryoröhrchen abgefüllt und bei -20°C bis zum Gebrauch gelagert.

Für einen Versuchsansatz wurde ein Kryoröhrchen aufgetaut und mit 600 µl PBS auf eine Konzentration von 1000 µg/ml verdünnt. Mit Hilfe dieser Lösung wurde eine Verdünnungsreihe von 0,625 µg/ml bis 15 µg/ml erstellt. Anschließend wurden 100 µl von jeder Verdünnungsstufe entnommen und den Kammern, die bereits 100 µl Zellsuspension enthielten, zugegeben.

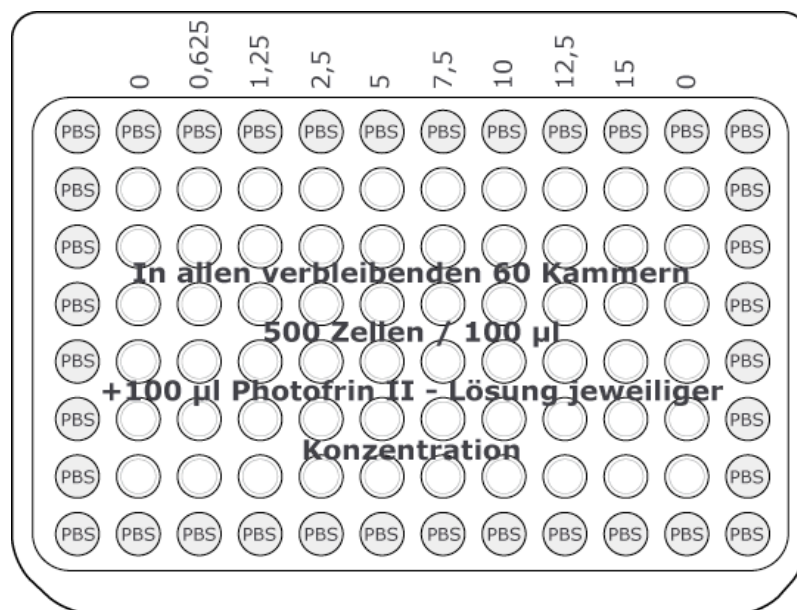


Abbildung 8: Verteilungs- und Beschriftungsschema einer 96 – well – plate nach Zugabe von Photofrin II

Dabei wurden Zellen in einer Reihe (je 6 Kammern) mit identischer Photofrin II – Konzentration inkubiert. Die inkubierten Zellen wurden dann für weitere 24 Stunden in einer feuchten und lichtgeschützten Kammer im Brutschrank aufbewahrt [53].

3.2.3 Bestrahlung und Dosimetrie

Die Bestrahlungen wurden an der Röntgenanlage Müller RT 250 der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radioonkologie des Universitätsklinikums Großhadern, München, durchgeführt.

Die Durchführung der unterschiedlichen Bestrahlungen erfolgte gemäß dem Versuchsaufbau von Schwarz et al. [61].

Alle Bestrahlungen wurden ohne Licht durchgeführt.

3.2.3.1 Versuchsaufbau zur Vorbestrahlung

Die Dosis von 0,05 Gy wurde gewählt, weil sie in experimentellen Versuchen an Blasenkarzinomzellen eine effektive adaptive Antwort hervorrufen konnte [7, 61].

Es bestanden folgende Versuchsbedingungen:

- Anodenspannung: 225 kV
- Stromstärke: 5 mA
- Dosisleistung: 0,03 Gy/min
- Filter: 0,35 mm Kupferfolie
- Tubus: 10 cm x 15 m x 40 cm
- Fokus-Oberflächen-Abstand FOA: 160 cm
- Strahlengang: vertikal, von oben nach unten
- Gleichmäßigkeit der Felddausleuchtung: besser als 97,8 %

Es wurden immer zwei Zellkulturschalen gleichzeitig, gemäß der Abbildung 9, aufgestellt und anschließend mit 0,05 Gy bestrahlt.

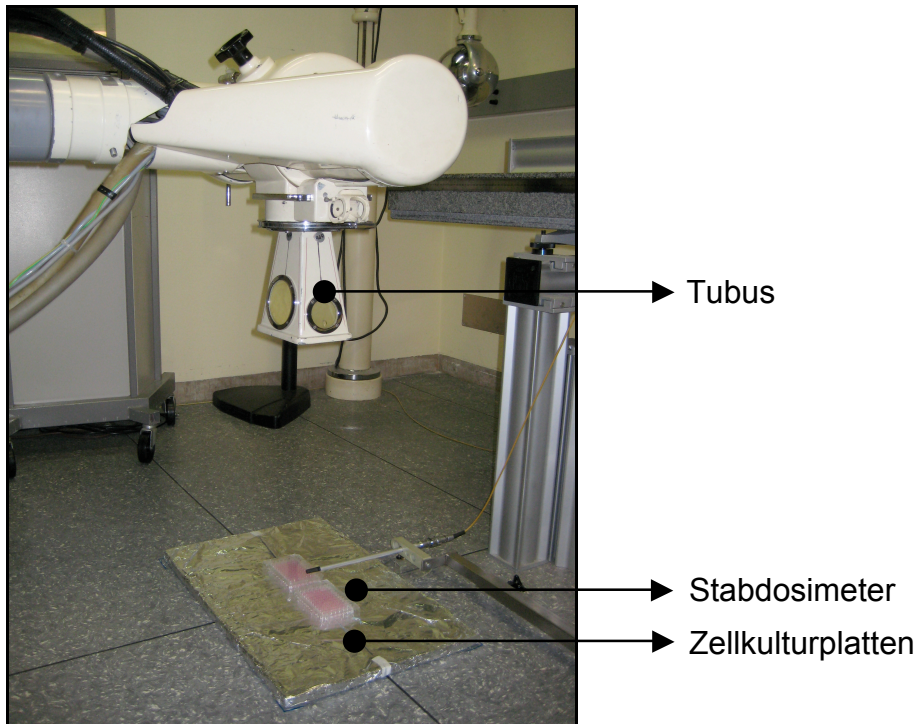


Abbildung 9: Versuchsaufbau zur Vorbestrahlung (zu Abbildungszwecken hier mit Licht)

3.2.3.2 Versuchsaufbau zur Hauptbestrahlung

Die Hauptbestrahlung von 2 Gy, welche der Dosis einer Bestrahlungsfraction während einer Radiotherapie bei einem Harnblasenkarzinoms entspricht, erfolgte 4 Stunden nach der Vorbestrahlung mit 0,05 Gy.

Da der Prozess der adaptiven Antwort eine Zeitspanne von 4 Stunden benötigt [21, 65, 66, 69, 78], wurde dieser Zeitrahmen zwischen der Vor- und Hauptbestrahlung eingehalten.

Die Bestrahlungsbedingungen für diesen Versuchskomplex wurden wie folgt gewählt:

- Anodenspannung: 225 kV
- Stromstärke: 15 mA
- Dosisleistung: 1 Gy/min
- Filter: 0,35 mm Kupferfolie
- Tubus: 10 cm x 15 cm x 40 cm, Tubusabschluss wurde durch einen Aufsatz mit einer wasserdurchfluteten Wärmeplatte aus Plexiglas (Dicke der Wasserschicht: 1,5 cm) ergänzt
- Fokus-Oberflächen-Abstand FOA: 51,5 cm
- Strahlengang: vertikal, von unten nach oben
- Gleichmäßigkeit der Feldausleuchtung: besser als 97,8 %

Damit auch während der Bestrahlung eine Temperatur von 37°C aufrecht erhalten konnte, wurden die mit den Zellen bestückten Platten auf einer mit 37°C warmen Wasser durchströmten Plexiglaskammer platziert.

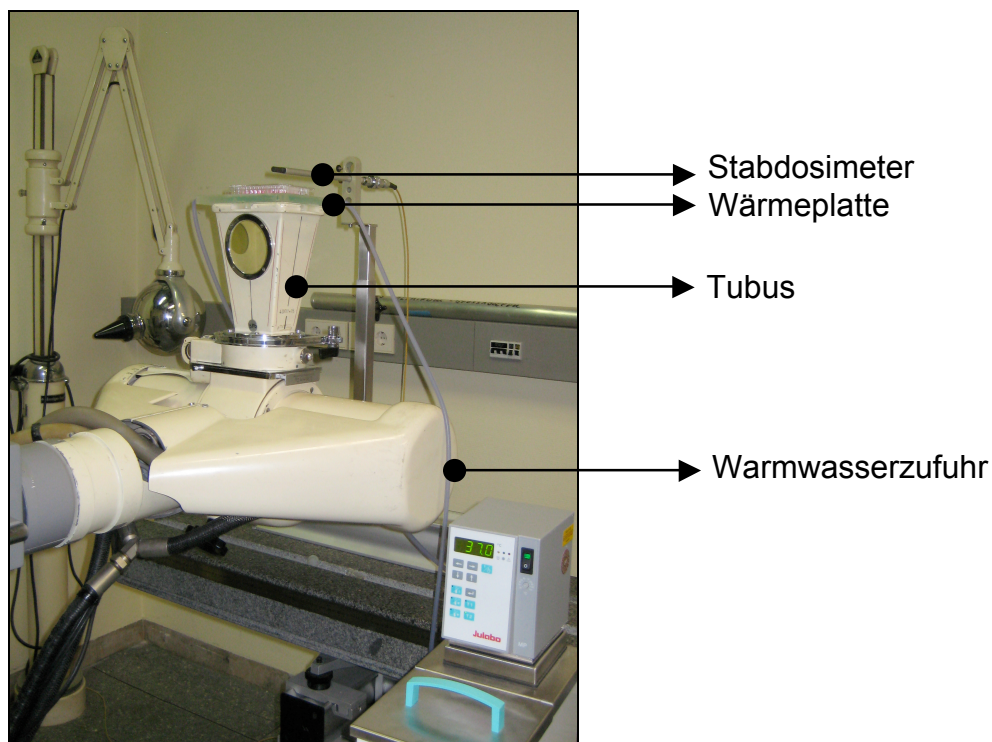


Abbildung 10: Versuchsaufbau zur Hauptbestrahlung (hier mit Licht zu Abbildungszwecken)

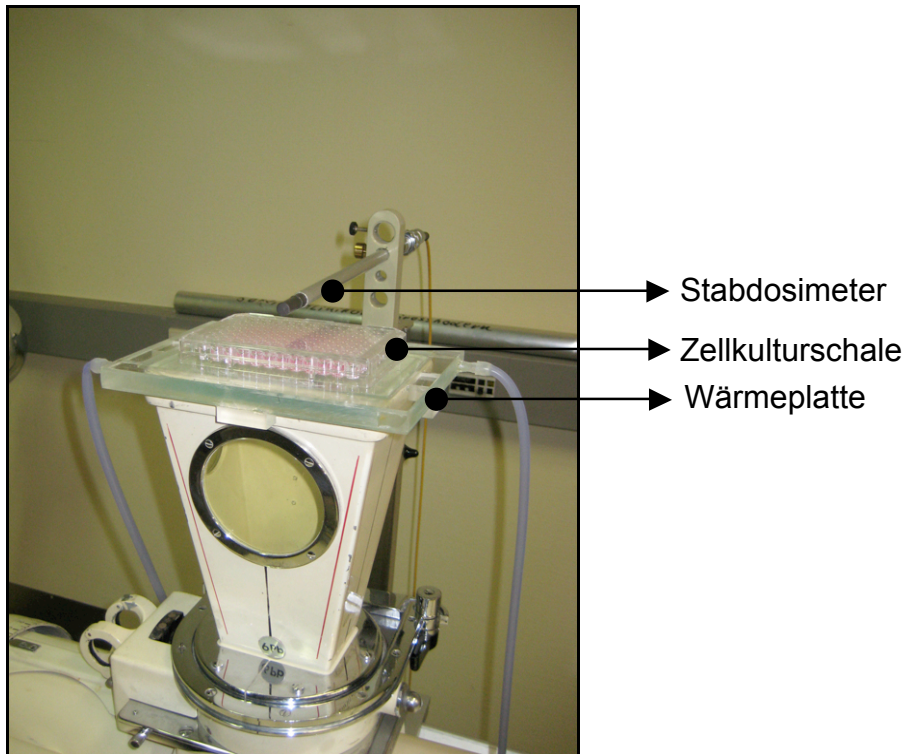


Abbildung 11: Detailansicht des Versuchsaufbaus zur Hauptbestrahlung

Während der Transportwege zwischen Labor und Bestrahlungsanlage wurden die Zellschalen in einer Styroporbox aufbewahrt, um die Umgebungsbedingungen möglichst stabil bei 37°C zu halten.

Die Dosimetrie für alle Versuche wurde mit Hilfe der „Abteilung Physik“ mittels Ionisations- und Thermoluminiszenzdosimetrie durchgeführt und auf den jeweiligen Versuchsaufbau abgestimmt.

3.2.4 Experimenteller Ablauf

3.2.4.1 Versuchskomplexe

Es wurde die Wirkung verschiedener Photofrin II – Konzentrationen in Kombination mit einer adaptiven Dosis von 0,05 Gy 4 Stunden vor einer Folgedosis von 2 Gy auf zwei Zelllinien (HCV29 und RT4) untersucht. Daraus ergaben sich folgende Versuchskomplexe:

Wirkung unterschiedlicher Photofrin II – Konzentrationen auf HCV29 – Zellen bei 0,05 Gy Vorbestrahlung und 2 Gy Folgedosis:

- a) 0 µg/ml Photofrin II
- b) 2,5 µg/ml Photofrin II
- c) 5 µg/ml Photofrin II
- d) 7,5 µg/ml Photofrin II
- e) 10 µg/ml Photofrin II

Wirkung unterschiedlicher Photofrin II – Konzentrationen auf RT4 – Zellen bei 0,05 Gy Vorbestrahlung und 2 Gy Folgedosis:

- a) 0 µg/ml Photofrin II
- b) 2,5 µg/ml Photofrin II
- c) 5 µg/ml Photofrin II
- d) 7,5 µg/ml Photofrin II
- e) 10 µg/ml Photofrin II

Pro Versuchskomplex wurden jeweils 4 Schalen mit 96 Kammern nach dem oben beschriebenen Schema mit Zellsuspension und Photofrin II beimpft, jedoch unterschiedlich bestrahlt:

- Schale A: keine Bestrahlung (Kontrollschale)
- Schale B: nur Vorbestrahlung (0,05 Gy)
- Schale C: nur Hauptbestrahlung (2 Gy)
- Schale D: Vorbestrahlung und nach 4h Hauptbestrahlung

3.2.4.2 Versuchsaufbau

Die Experimente wurden in Kulturschalen mit je 96 Kammern durchgeführt. RT4- und HCV29 – Zellen wurden in einer Dichte von 500 Zellen pro Kammer ausgesät. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden im Brutschrank wurden pro Kammer 100 µl einer Photofrin II – Lösung zugegeben, sodass eine Endkonzentration von 2,5 µg/ml, 5 µg/ml, 7,5 µg/ml bzw. 10 µg/ml Photofrin II jeweils als 6fach Ansatz entstand.

Die so vorbehandelten Schalen wurden danach erneut für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Am Bestragungstag wurden zunächst die Schalen B und D mit einer Dosis von 0,05 Gy vorbestrahlt. Vier Stunden danach erfolgte die Bestrahlung mit 2 Gy (entsprechend der Dosis einer Bestrahlungsfraction eines Patienten) der Schalen C und D. Die Schale A wurde nicht bestrahlt, sie diente als Kontrollschale.

Nach der Bestrahlung wurden die Schalen für weitere 4 Tage im Brutschrank inkubiert.

Nach 4 Tagen wurde eine WST – 1 – Lösung zu der Zellsuspension hinzugegeben und das Zellüberleben mittels eines ELISA Readers ermittelt.

Die Versuche wurden mindestens viermal wiederholt, um eine aussagekräftige Datenmenge zu erhalten. Damit stand ein Minimum von 24 Einzeldaten für die Auswertung zur Verfügung.

3.2.5 Analyse des Zellüberlebens

Die Antwort der Zellen auf die Bestrahlung wurde durch die Überlebensrate der proliferierenden Zellen ermittelt.

Zunächst wurde das alte Medium mit Photofrin II aus allen Kammern verworfen. Anschließend wurden pro Kammer 100 µl Medium mit 10 % WST – 1 – Lösung hinzugegeben.

WST – 1 (Tetrazolium Salz 4 – [3 – (4 – Iodophenyl) – 2(4 – Nitrophenyl) – 2H – 5 – Tetrazolin] – 1,3 – Benzene Disulfonat) ist ein Reagenz, mit dessen Hilfe proliferierende Zellen nachgewiesen werden können. Es ermöglicht die nicht radioaktive spektrophotometrische Quantifizierung von Zellproliferation, Wachstum, Variabilität und Chemosensitivität für Zellpopulationen in 96 – well – plates.

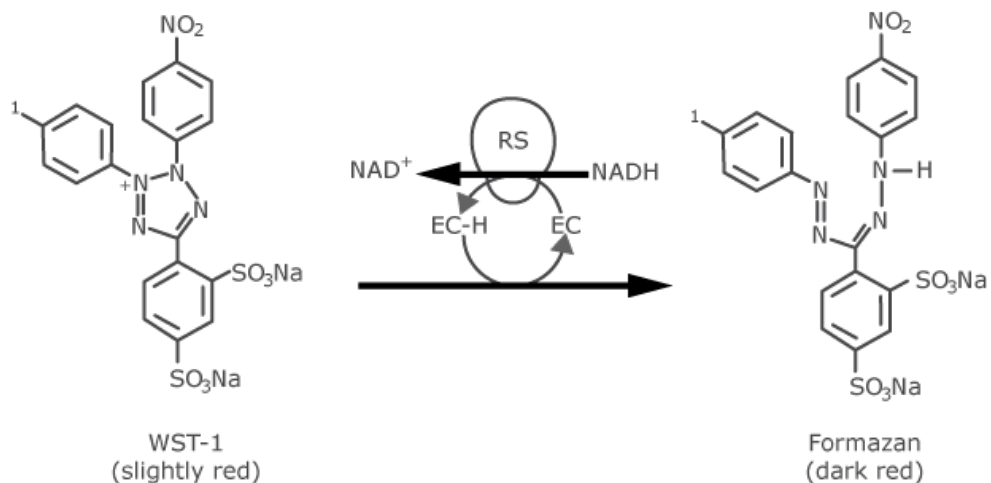


Abbildung 12: Spaltung des Tetrazolium Salzes WST – 1 (hellrot) zu Formazan (dunkelrot)

Vitale, stoffwechselaktive Zellen sind in der Lage WST – 1 zu dem wasserlöslichen Farbstoff Formazan zu spalten. Dieser Vorgang wird durch einen Farbwechsel sichtbar. Dabei korreliert die Menge des entstandenen Farbstoffes mit der Anzahl der metabolisch aktiven Zellen und kann spektrophotometrisch mit dem ELISA Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm erfasst werden. Die optische Dichte wurde sofort nach Beimpfung und 4 Stunden nach Inkubation mit WST – 1 gemessen.

3.2.6 Auswertung und Statistik

Für die Auswertung wurden die Werte der optischen Dichte aus den Messungen mit dem ELISA Reader zunächst in Tabellen zusammengefasst. Insgesamt ergaben sich für die HCV29 – Zellen 36 Einzelwerte und für die RT4 – Zellen 24 Einzelwerte. Es wurden nur Versuche in die Auswertung einbezogen, bei denen sich die Zellen noch in der Wachstumsphase befanden. Dies wurde durch die mitlaufende Standardplatte überprüft und sichergestellt.

Um die Überlebensdaten aus mehreren identischen Versuchen zusammenfassen zu können, musste die unterschiedliche Anwachsrate der Zellen in den verschiedenen Versuchskomplexen berücksichtigt werden. Dazu wurde der Mittelwert der unbehandelten und unbestrahlten Kontrolle eines Versuchskomplexes mit einem Faktor (K) multipliziert, der diesen Kontrollmittelwert gleich 1 (100 %) setzt. Mit diesem Faktor (K) wurden anschließend alle Werte aus diesem Versuchskomplex multipliziert.

Nach den Umrechnungen wurde die statistische Auswertung der Ergebnisse mit Hilfe des zweiseitigen Students – t – Tests für unabhängige Stichproben durchgeführt, wobei für $p < 0,05$ ein signifikanter Unterschied zwischen zwei Werten angenommen wurde.

4 Ergebnisse

4.1 Vorversuche

Es wurden zwei grundlegende Vorversuche durchgeführt, um eine effektive Gestaltung der Folgeexperimente zu gewährleisten.

Durch den ersten Vorversuch wurde die optimal einzusäende Zellzahl pro Kammer ermittelt. Es zeigte sich, dass eine Einsaat von 500 Zellen pro Kammer am besten für die geplanten Versuchsreihen geeignet ist.

Der zweite Vorversuch prüfte die Wirkung von unterschiedlichen Photofrin II – Konzentrationen zunächst im Konzentrationsbereich von 0,625 µg/ml bis 15 µg/ml (siehe Abbildung 8). Unter Berücksichtigung der klinischen Anwendung von Photofrin II und dessen Fähigkeit zur Akkumulation in den Zellen, zeigte sich ein Untersuchungsspektrum von 2,5 µg/ml bis 10 µg/ml am aussagekräftigsten.

4.2 Wirkung von Photofrin II auf RT4 – Zellen

4.2.1 Inkubation mit Photofrin II ohne Bestrahlung

Es wurde beobachtet, dass eine Inkubation mit Photofrin II mit steigender Konzentration eine toxische Auswirkung auf das Zellüberleben der RT4 – Zellen hat. Dieser Einfluss ist konzentrationsabhängig und stellt sich im Bereich von 7,5 µg/ml bis 10 µg/ml signifikant toxisch dar. Bei einer Konzentration von 2,5 µg/ml wurde ein signifikant erhöhtes RT4 – Zellüberleben beobachtet.

Photofrin II (µg/ml)	Mittelwert Zellüberleben (normiert auf 1)	Varianz Zellüberleben	signifikant bei $p \leq 0,05$
0	1,000	0,01	
2,5	1,068	0,03	0.0043448*
5	0,941	0,05	0.2244150
7,5	0,731	0,03	0,0000753*
10	0,681	0,01	6.0386E ⁻¹⁴ *

Tabelle 2: Einfluss verschiedener Photofrin II – Konzentrationen auf das Zellüberleben von RT4 – Zellen ohne Bestrahlung; *statistisch signifikant

4.2.2 Inkubation mit Photofrin II und Vorbestrahlung

Nach Bestrahlung der mit Photofrin II inkubierten RT4 – Zellen mit einer geringen Dosis von 0,05 Gy, resultiert für Konzentrationen zwischen 7,5 µg/ml und 10 µg/ml ein signifikant vermindertes Zellüberleben im Vergleich zur Kontrolle. Für eine Photofrin II – Konzentration von 2,5 µg/ml präsentiert sich ein signifikant gesteigertes Zellüberleben. Bei einer Konzentration von 5 µg/ml zeigt sich tendenziell ein vermindertes Zellüberleben, wobei diese Veränderung nicht signifikant ist.

Photofrin II (µg/ml)	Mittelwert Zellüberleben (normiert auf 1)	Varianz Zellüberleben	signifikant bei $p \leq 0,05$
0	0,989	0,01	
2,5	1,071	0,02	0.009101785*
5	0,924	0,07	0.262542843
7,5	0,717	0,02	0,000000006*
10	0,667	0,01	3.1728E ¹⁷ *

Tabelle 3: Einfluss verschiedener Photofrin II – Konzentrationen auf das Zellüberleben von RT4 – Zellen bei 0,05 Gy; *statistisch signifikant

4.2.3 Inkubation mit Photofrin II und Hauptbestrahlung

Für RT4 – Zellen, die mit Photofrin II inkubiert und mit einer Dosis von 2 Gy bestrahlt wurden, konnte ein signifikant vermindertes Zellüberleben für die Konzentrationen 5 µg/ml, 7,5 µg/ml und 10 µg/ml im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden.

Photofrin II (µg/ml)	Mittelwert Zellüberleben (normiert auf 1)	Varianz Zellüberleben	signifikant bei $p \leq 0,05$
0	0,911	0,01	
2,5	0,978	0,04	0.11725211
5	0,816	0,04	0.04947688*
7,5	0,669	0,02	0,00000011*
10	0,565	0,01	4.65461E ⁻¹⁵ *

Tabelle 4: Einfluss verschiedener Photofrin II – Konzentrationen auf das Zellüberleben von RT4 – Zellen bei 2 Gy Bestrahlungsdosis; *statistisch signifikant

4.2.4 Inkubation mit Photofrin II und Bestrahlungskombinationen

Die RT4 – Zellen wurden 4 Stunden vor der Hauptbestrahlung (2 Gy) mit einer Bestrahlungsdosis von 0,05 Gy vorbehandelt. Bei der Auswertung wurde ein signifikant vermindertes Zellüberleben für die Photofrin II – Konzentrationen von 5 µg/ml, 7,5 µg/ml und 10 µg/ml im Vergleich zur Kontrolle deutlich.

Photofrin II (µg/ml)	Mittelwert Zellüberleben (normiert auf 1)	Varianz Zellüberleben	signifikant bei $p \leq 0,05$
0	1,043	0,02	
2,5	1,076	0,04	0.4725298748
5	0,935	0,05	0.0355682188*
7,5	0,763	0,03	0,0000000053*
10	0,687	0,01	1.6377E ⁻¹⁸ *

Tabelle 5: Einfluss verschiedener Photofrin II – Konzentrationen auf das Zellüberleben von RT4 – Zellen bei Bestrahlung mit 0,05 Gy + 2 Gy;

***statistisch signifikant**

Zusammenfassend ergibt sich aus diesen Beobachtungen, dass Photofrin II seine strahlensensibilisierende Wirkung sowohl bei der Hauptbestrahlung als auch bei Kombination der Hauptbestrahlung mit einer adaptiven Dosis von 0,05 Gy beibehält. Allerdings ist hier die strahlensensibilisierende Wirkung von Photofrin II weniger deutlich als bei alleiniger Applikation der Hauptbestrahlungsdosis.

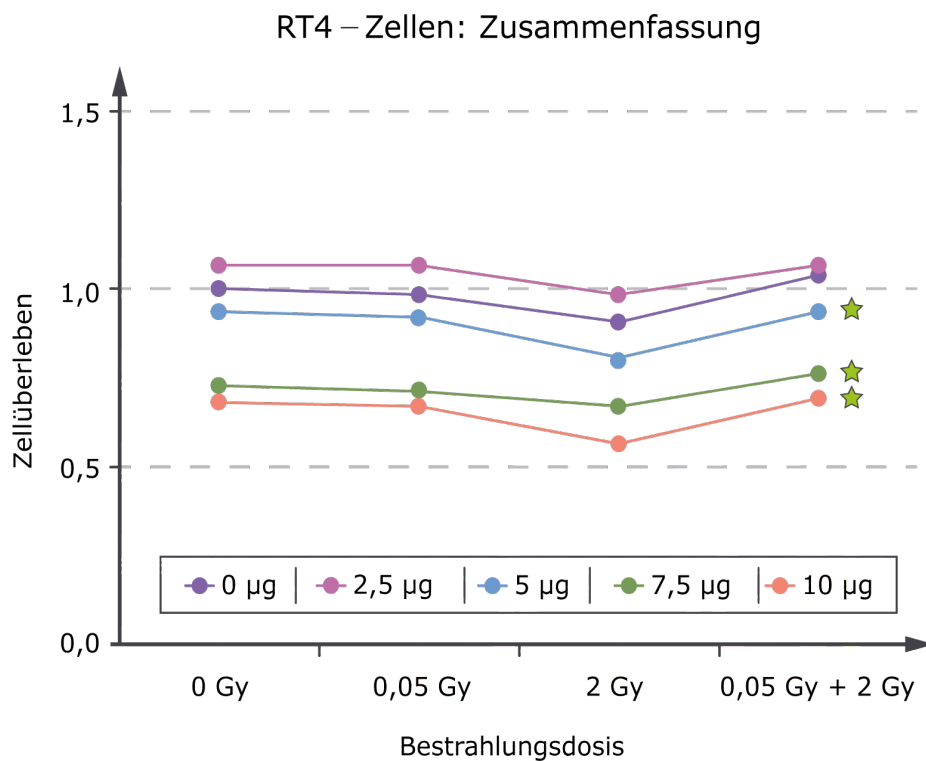


Diagramm 1: Zusammenfassung der Wirkung von unterschiedlichen Photofrin II – Konzentrationen ohne Bestrahlung, bei 0,05 Gy, bei 2 Gy und bei 0,05 Gy + 2 Gy; ★ Zellüberleben der RT4 – Zellen signifikant vermindert

4.2.5 Einfluss der Vorbestrahlung auf das Zellüberleben

Um den Einfluss der adaptiven Dosis zu ermitteln, wurden die Daten der Zellüberlebensraten nach alleiniger Hauptbestrahlung mit den Zellüberlebensraten nach Vor- und Hauptbestrahlung verglichen. Es stellte sich heraus, dass bei der Kombination von Vor- und Hauptbestrahlung im Vergleich zur alleinigen Hauptbestrahlung ein erhöhtes Zellüberleben der RT4 – Zellen zu beobachten war. Für die Photofrin II – Konzentrationen von 7,5 µg/ml und 10 µg/ml war das Zellüberleben sogar signifikant erhöht. Dabei wurde die strahlensensibilisierende Wirkung von Photofrin II durch den Einfluss der adaptiven Dosis nicht aufgehoben.

Photofrin II (µg/ml)	Mittelwert Zellüberleben (2 Gy)	Mittelwert Zellüberleben (0,05 Gy + 2 Gy)	signifikant bei $p \leq 0,05$
0	0,911	1,043	0,000032*
2,5	0,987	1,076	0.096582
5	0,816	0,935	0.057591
7,5	0,669	0,763	0.043064*
10	0,565	0,687	0.000349*

Tabelle 6: Einfluss der Vorbestrahlung (0,05 Gy) im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung mit 2 Gy bei unterschiedlichen Photofrin II – Konzentrationen; *statistisch signifikant

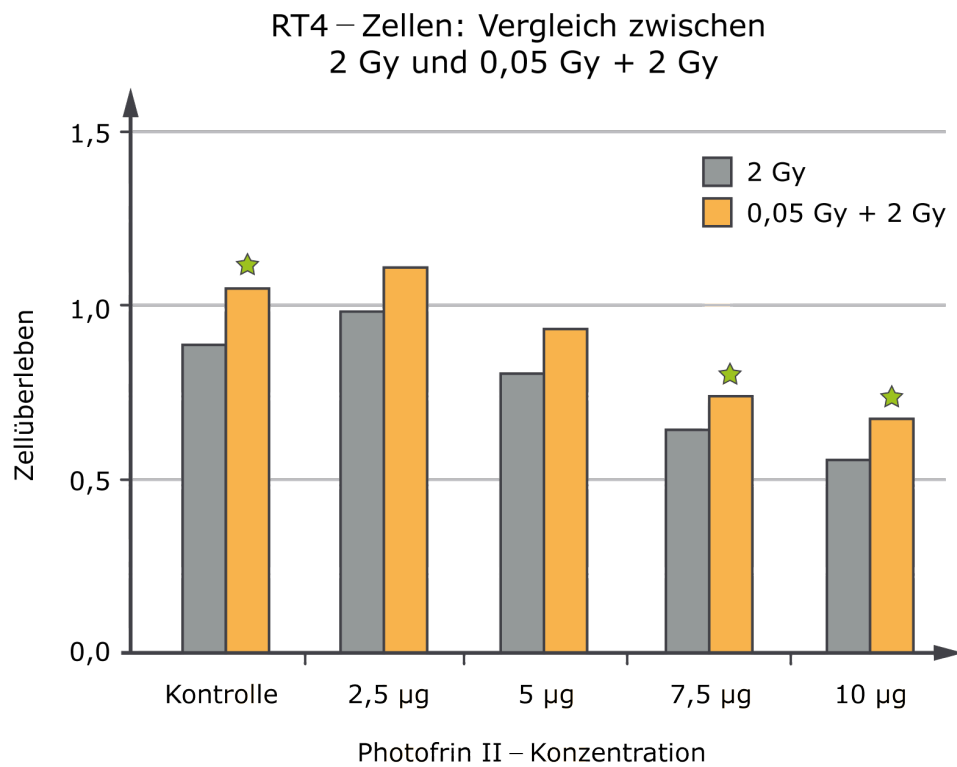


Diagramm 2: Wirkung der alleinigen Hauptbestrahlung mit 2 Gy im Vergleich zu der Wirkung von Vorbestrahlung (0,05 Gy) in Kombination mit Folgebestrahlung (2 Gy): ★ Zellüberleben der RT4 – Zellen statistisch signifikant erhöht.

4.3 Wirkung von Photofrin II auf HCV29 – Zellen

4.3.1 Inkubation mit Photofrin II ohne Bestrahlung

Die Inkubation der HCV29 – Zellen mit Photofrin II wirkt ab einer Konzentration von 5 µg/ml signifikant toxisch auf die normalen Urothelzellen. Bei einer Photofrin II – Konzentration von 2,5 µg/ml liegt keine signifikante Verminderung des Zellüberlebens vor.

Photofrin II (µg/ml)	Mittelwert Zellüberleben (normiert auf 1)	Varianz Zellüberleben	signifikant bei $p \leq 0,05$
0	1,01	0,02	
2,5	0,99	0,02	0.4289954
5	0,79	0,02	$1.2797E^{-11}$ *
7,5	0,62	0,02	$8.8339E^{-20}$ *
10	0,53	0,06	$2.4056E^{-14}$ *

Tabelle 7: Einfluss verschiedener Photofrin II – Konzentrationen auf das Zellüberleben von HCV29 – Zellen ohne Bestrahlung; *statistisch signifikant

4.3.2 Inkubation mit Photofrin II und Vorbestrahlung

Werden die HCV29 – Zellen mit Photofrin II inkubiert und anschließend mit 0,05 Gy bestrahlt, so sinkt das Zellüberleben bei einer Photofrin II – Konzentration von 5 µg/ml bis 10 µg/ml signifikant ab. Für eine Photofrin II – Konzentration von 2,5 µg/ml kann keine signifikante Abnahme des Zellüberlebens beobachtet werden.

Photofrin II (µg/ml)	Mittelwert Zellüberleben (normiert auf 1)	Varianz Zellüberleben	signifikant bei $p \leq 0,05$
0	1,04	0,03	
2,5	1,00	0,01	0.119884
5	0,78	0,01	$2.396E^{-16}$ *
7,5	0,60	0,02	$1.962E^{-09}$ *
10	0,48	0,02	$1.114E^{-30}$ *

Tabelle 8: Einfluss verschiedener Photofrin II – Konzentrationen auf das Zellüberleben von HCV29 – Zellen bei 0,05 Gy; *statistisch signifikant

4.3.3 Inkubation mit Photofrin II und Hauptbestrahlung

Bei einer Photofrin II – Konzentration von 2,5 µg/ml kann kein signifikant vermindertes Zellüberleben nachgewiesen werden. Ab einer Konzentration von 5 µg/ml wird eine toxische Wirkung nachweislich signifikant.

Photofrin II (µg/ml)	Mittelwert Zellüberleben (2 Gy)	Mittelwert Zellüberleben (0,05 Gy + 2 Gy)	signifikant bei $p \leq 0,05$
0	0,686	0,718	0,345
2,5	0,695	0,747	0,140
5	0,599	0,605	0,858
7,5	0,466	0,520	0,119
10	0,433	0,428	0,900

**Tabelle 9: Einfluss verschiedener Photofrin II – Konzentrationen auf das Zellüberleben von HCV29 – Zellen bei 2 Gy Bestrahlungsdosis;
*statistisch signifikant**

4.3.4 Inkubation mit Photofrin II und Bestrahlungskombinationen

Die Kombination aus Vor- und Hauptbestrahlung erhöht bei einer Photofrin II – Konzentration von 2,5 µg/ml tendenziell das Zellüberleben der HCV29 – Zellen. Ab einer Konzentration von 5 µg/ml wird das Zellüberleben jedoch signifikant vermindert.

Photofrin II (µg/ml)	Mittelwert Zellüberleben (normiert auf 1)	Varianz Zellüberleben	signifikant bei $p \leq 0,05$
0	0,718	0,04	
2,5	0,747	0,03	0.41470388
5	0,605	0,02	0.00123342*
7,5	0,520	0,03	0,00000089*
10	0,428	0,02	1.028E ⁻¹² *

Tabelle 10: Einfluss verschiedener Photofrin II – Konzentrationen auf das Zellüberleben von HCV29 – Zellen bei 0,05 Gy + 2 Gy; *statistisch signifikant

Zusammenfassend wirkt sich eine Photofrin II – Konzentration ab 5 µg/ml ohne Bestrahlung toxisch auf die Urothelzellen aus. Sowohl bei der Hauptbestrahlung alleine, als auch bei der Kombination aus Vor- und Hauptbestrahlung kann jedoch bei einer Konzentration von 2,5 µg/ml eine tendenziell schützende Wirkung beobachtet werden.

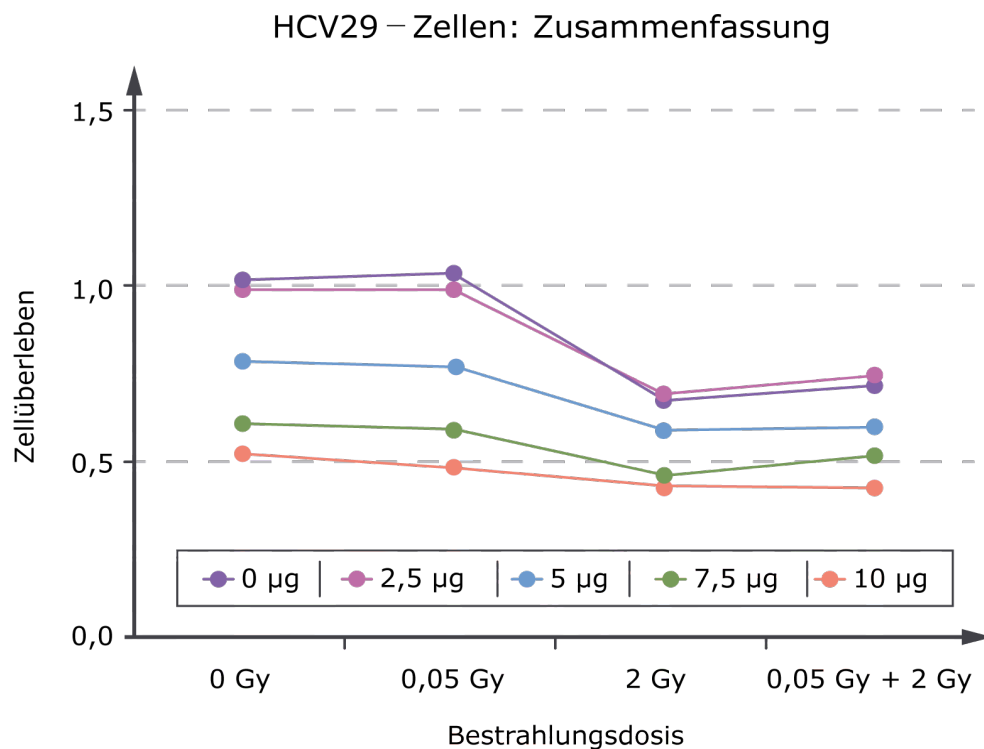


Diagramm 3: Zusammenfassung der Wirkung von unterschiedlichen Photofrin II – Konzentrationen ohne Bestrahlung, bei 0,05 Gy, bei 2 Gy alleine und bei 0,05 Gy + 2 Gy

4.3.5 Einfluss der Vorbestrahlung auf das Zellüberleben

Im direkten Vergleich der Wirkung der alleinigen Hauptbestrahlung von 2 Gy und der Kombination aus Vorbestrahlung (0,05 Gy) und Folgebestrahlung (2 Gy) auf HCV29 – Zellen zeigt sich tendenziell ein erhöhtes Zellüberleben, welches aber nicht signifikant war.

Photofrin II (µg/ml)	Mittelwert Zellüberleben (2 Gy)	Mittelwert Zellüberleben (0,05 Gy + 2 Gy)	signifikant bei $p \leq 0,05$
0	0,686	0,718	0,345
2,5	0,695	0,747	0,140
5	0,599	0,605	0,858
7,5	0,466	0,520	0,119
10	0,433	0,428	0,900

Tabelle 11: Einfluss der Vorbestrahlung (0,05 Gy) im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung mit 2 Gy bei unterschiedlichen Photofrin II – Konzentrationen

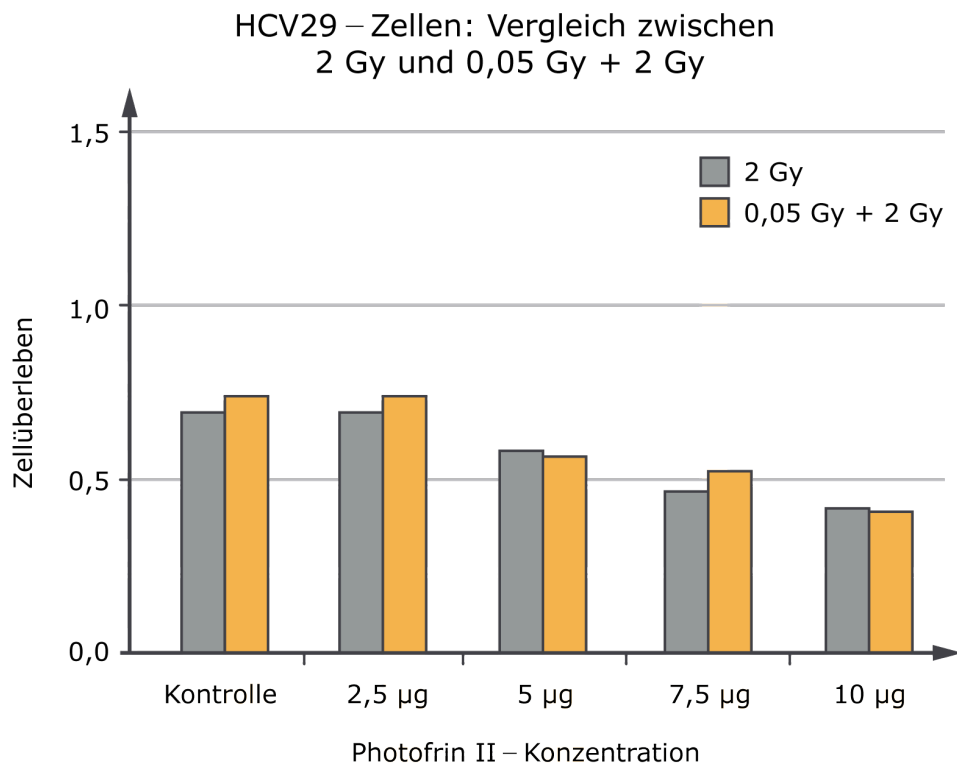


Diagramm 4: Wirkung der alleinigen Hauptbestrahlung mit 2 Gy im Vergleich zu der Wirkung von Vorbestrahlung (0,05 Gy) in Kombination mit Folgebestrahlung (2 Gy)

5 Diskussion

Das Ziel dieser Doktorarbeit war es in *in vitro* Experimenten zu überprüfen, ob die eigentlich gegenläufigen Effekte des Radiosensitizers Photofrin II in Kombination mit der adaptiven Strahlenantwort eine Steigerung des Therapieerfolgs bewirken könnten.

Die Experimente dieser Arbeit wurden an HCV29 – Zellen und an RT4 – Zellen durchgeführt. Die HCV29 – Zellen repräsentieren gesundes Urothel, welches als Übergangsepithel ein mehrschichtiges Deckgewebe der ableitenden Harnwege darstellt. Die RT4 – Zellen vertreten die Harnblasentumorzellen. Diese Zelllinien wurden für die Analyse ausgewählt, da die Wirkung der adaptiven Antwort an diesen Zellen schon untersucht und belegt wurde [61]. Allerdings sollte beachtet werden, dass die hier verwendeten RT4 – Zellen stellvertretend für verschiedene Zellarten des Harnblasenkarzinoms stehen, deren eventuelle Abweichungen im Reaktionsverhalten nicht berücksichtigt werden konnten.

Die hier angewendeten Methoden der Zellkultivierung und der experimentellen Versuchsdurchführung wurden nach den im strahlenbiologischen Labor etablierten Verfahren und mit äußerster Sorgfalt durchgeführt.

In dieser Arbeit wurden nur die Auswirkungen von Photofrin II und adaptiver Dosis auf HCV29 – und RT4 – Zellen untersucht. Daher können keine Aussagen über eventuelle kombinatorische Effekte bei anderen Tumorzelllinien oder unter Verwendung anderer radioadaptiver Dosen sowie anderen Photofrin II – Konzentrationen oder Inkubationsbedingungen gemacht werden.

Auswirkungen auf die Zellen:

RT4 – Zellen

Der strahlensensibilisierende Effekt von Photofrin II auf RT4 – Zellen konnte in allen Versuchsreihen nachgewiesen werden. Die signifikant toxische/strahlensensibilisierende Wirkung stellte sich bei Inkubation mit Photofrin II ohne Bestrahlung und mit Vorbestrahlung bei einer Konzentration von 7,5 µg/ml ein. Bei der alleinigen Hauptbestrahlung und bei der Kombination aus Vor – und Hauptbestrahlung trat der strahlensensibilisierende Effekt bereits bei einer Konzentration von 5 µg/ml ein.

Bei Betrachtung des Einflusses der adaptiven Dosis auf das Zellüberleben der RT4 – Zellen, ließ sich eine adaptive Wirkung auf die RT4 – Zellen nachweisen. Diese Auswirkung der adaptiven Dosis ist sowohl ohne Applikation von Photofrin II als auch ab einer Photofrin II – Konzentration von 7,5 µg/ml signifikant. Der strahlensensibilisierende Effekt von Photofrin II konnte dennoch beobachtet werden, allerdings war dieser durch die adaptive Wirkung der Vorbestrahlung abgeschwächt. Ein Vorteil aus der Kombination von Photofrin II mit der adaptiven Dosis auf RT4 – Zellen ist demnach nicht feststellbar.

Die Versuche, die in dieser Arbeit durchgeführt wurden, konnten die Untersuchungen von Schaffer et al. zur Wirkung von Photofrin II als Radiosensitizer bestätigen.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Schwarz et al. ließ sich in den hier durchgeführten Experimenten eine adaptive Antwort von RT4 – Zellen nachweisen. Diese Diskrepanz könnte auf die unterschiedlichen Auswertungsmethoden zurückgeführt werden. Während Schwarz et al. die Überlebensrate anhand von Koloniezählungen bestimmten, wurde in dieser Arbeit eine automatisierte Auswertung mittels des ELISA Readers durchgeführt [61].

HCV29 – Zellen

Eine signifikante adaptive Antwort in HCV29 – Zellen konnte nicht nachgewiesen werden, allerdings wurde eine Tendenz zur Erhöhung des Zellüberlebens bei einer Bestrahlungskombination beobachtet.

Der toxische/strahlensensibilisierende Effekt von Photofrin II lässt sich ohne Bestrahlung und bei den getesteten Bestrahlungsmodi ab einer Konzentration von 5 µg/ml signifikant nachweise, jedoch nicht für eine Konzentration von 2,5 µg/ml.

Beim Vergleich des Zellüberlebens von HCV29 – Zellen nach alleiniger Hauptbestrahlung und bei kombinierter Vor- und Hauptbestrahlung zeigte sich in jedem Fall der toxische Einfluss von Photofrin II ab einer Konzentration von 5 µg/ml. Eine nicht signifikante Tendenz zur adaptiven Wirkung ließ sich auch in Anwesenheit von Photofrin II nachweisen.

Die Resultate von Schwarz et al. zur signifikanten Induktion einer adaptiven Antwort in HCV29 – Zellen, welche sich über einen protektiven Mechanismus in einem gesteigerten Zellüberleben äußert, wurden in den vorliegenden Experimenten nicht bestätigt, es zeigte sich aber ebenfalls eine entsprechende Tendenz [61].

Übertragung auf den Organismus:

Der genaue Wirkmechanismus der adaptiven Antwort konnte, wie auch der von Photofrin II, noch nicht vollständig geklärt werden.

Die Aufnahme von Photofrin II in Tumorzellen und Normalzellen erfolgt nicht gleichmäßig. Die Photofrin II Aufnahme in gesunde Zellen erfolgt gemäß der klinischen Applikationsdosis von 1,5 µg/ml – 2,5 µg/ml, da gesunde Zellen keine erhöhte Aufnahme und somit keine intrazelluläre Photofrin II – Anreicherung zeigen. Im Gegensatz dazu akkumuliert Photofrin II selektiv in Tumorzellen [28, 51, 58] und es ist davon auszugehen, dass im Tumorgewebe

eine Photofrin II – Konzentration zwischen 5 µg/ml – 10 µg/ml *in vivo* erreicht werden kann [8, 20, 26, 55]. Dieser Effekt wurde in *in vivo* Experimenten an Nacktmäusen bestätigt [51, 55].

Photofrin II gehört zur Gruppe der Porphyrine, die selektiv wirken und in niedrigen Konzentrationen *in vivo* keine messbare Toxizität aufweisen [29]. Die zelluläre Aufnahme, die intrazelluläre Verteilung und die Retention von Photofrin II in den Zellen sind von mikrobiologischen Umgebungsbedingungen im Tumor abhängig. Unter normalen Zellkulturbedingungen wird dieser Zustand nur bedingt nachgeahmt. Da die Anreicherung von Photofrin II jedoch durch ebensolche gewebephysiologischen Prozesse bedingt ist, wird unter *in vitro* Zellkulturbedingungen dieser Zustand der Akkumulation durch Erhöhung der Photofrin II – Konzentration simuliert.

Bei einer Photofrin II – Konzentration von 2,5 µg/ml in der Nicht – Tumorzelllinie HCV29 kommt es weder zu einer toxischen noch zu einer strahlensensitivierenden Wirkung. Bei einer Applikation dieser Photofrin II – Konzentration *in vivo* erfolgt im Normalgewebe keine Anreicherung des Photosensitizers. Im Gegensatz dazu ist davon auszugehen, dass es bei einer Applikation von 2,5 µg/ml Photofrin II im Organismus zu einer akkumulierten Dosis von 7,5 µg/ml im Tumorgewebe kommt. Dies führt sowohl mit als auch ohne adaptive Bestrahlung zu einer erhöhten Strahlenempfindlichkeit des Tumorgewebes, nicht jedoch des Normalgewebes, da hier keine Photofrin II Anreicherung erfolgt. Bezogen auf den Gesamtorganismus lässt sich somit eine Wirkungssteigerung der Strahlentherapie durch Photofrin II erwarten. Eine Kombination mit der adaptiven Vorbestrahlungsdosis zum Schutz des Normalgewebes erscheint dagegen weniger erfolgversprechend.

Vorangehende Machbarkeitsstudien an Patienten haben gezeigt, dass in Patienten bei Anwendung von Photofrin II in einer Konzentration von bis zu 2,5 µg/ml, keine strahlensensitivierende Wirkung im Normalgewebe nachweisbar war. Die Nebenwirkungen gingen nicht über die üblichen Auswirkungen, wie leichte Diarrhö, Übelkeit und Hautreaktionen [54, 59], hinaus.

In verschiedenen *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen konnte eindeutig gezeigt werden, dass Photofrin II eine selektive und radiosensitivierende Wirkung auf Harnblasentumorzellen hat [28, 51, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59]. Es ist davon auszugehen, dass an den Wirkmechanismen, die zu diesen Effekten führen sowohl zytotoxische Moleküle wie Hydroxyl – Radikale als auch die Bindung von Photofrin II an Proteine, welche an Reparaturprozessen mitwirken und diese dadurch unterdrücken, beteiligt sind.

Eine genaue Darstellung des Funktionsmechanismus von Photofrin II ist zurzeit noch nicht möglich, da es sich um eine heterogene chemische Zusammensetzung mit zum Teil noch unbekannten Komponenten handelt [8, 55]. Es gibt jedoch Hinweise, dass die radiosensitivierende Wirkung von Photofrin II an Tumorgewebe mit den oligomerischen Eigenschaften der Substanz in Verbindung steht. Diese Eigenschaften bewirken eine starke Aggregation des Radiosensitizers in biologischen Medien, was die Entwicklung einer hoch hydrophoben Struktur zur Folge hat. Es ist nachgewiesen, dass ein höherer Grad an Hydrophobie solcher Oligomere zu einer Akkumulation im Tumorgewebe führt [55].

Entsprechende Oligomere können effektiv durch einige zytotoxische Mediatoren wie Hydroxyl – Radikale erzeugt werden [26, 28, 32, 55]. Als Konsequenz wird eine große Zahl von Radikalen durch eine Kettenreaktion mit Photofrin II zu Aggregaten geformt, wobei Photofrin II als Amplifikationsfaktor der Bestrahlung agiert. Dieser Mechanismus wurde für Gd – Tex bereits bestätigt [5, 86] und wird

auch für Photofrin II vermutet. Gestützt wird diese Vermutung durch Untersuchungen, die belegen, dass die radiosensitivierende Wirkung von Photofrin II in Gegenwart von Mannitol, einem Hydroxyl – Radikal – Fänger, ausbleibt. Erhöhtes Zellüberleben konnte bei zusätzlicher Gabe von Mannitol oder Histidin beobachtet werden [62]. Dies unterstützt die Annahme, dass an dem Wirkmechanismus von Photofrin II die Formation von Radikal – Derivaten hoher Reaktivität, wie beispielsweise Hydroxyl – Radikale beteiligt ist [62]. Der zentrale Einfluss von Sauerstoff auf die radiosensitivierende Wirkung von Photofrin II wurde ebenfalls experimentell nachgewiesen. Wurde die Sauerstoffkonzentration während der Inkubationsphase von RT4 – Zellen mit Photofrin II auf 5 % reduziert, war die radiosensitivierende Wirkung stark vermindert. Dieser Effekt wurde ebenfalls für Hypericin, einen weiteren Radiosensitizer, nachgewiesen [60].

Zudem gibt es Hinweise auf den limitierenden Einfluss von Photofrin II auf den Reparaturprozess von subletalen Zellschäden nach ionisierender Strahlung. Dies kann in der Tumorkontrolle hilfreich sein. Ionisierende Strahlung ruft zwei Arten von Zellschäden hervor: letale und subletale Schäden. Der subletale Schaden kann in einen letalen übergehen und somit zum Absterben der Zelle führen oder es werden Reparaturmechanismen stimuliert, die das Zellüberleben ermöglichen. Photofrin II reduziert möglicherweise die Chance für Reparaturprozesse in Kombination mit ionisierender Strahlung [32, 56], was zu einer höheren Empfindlichkeit der Tumorzellen gegenüber ionisierender Strahlung führt.

Der radiosensitivierende Effekt von Photofrin II wurde nur bei radioresistenten Tumoren, wie Harnblasenkarzinomen und Lewis Sarkomen [1, 19, 28] nachgewiesen, nicht aber bei radiosensitiven Tumoren, wie dem Adenokarzinom des Ösophagus [57]. *In vivo* Untersuchungen zeigten dies an RT4 –, U373 – und HT29 – Zellen [28].

Der Einsatz einer niedrig dosierten Strahlendosis kann eine adaptive Antwort im Sinne einer Schutzwirkung induzieren, was besonders in Nicht – Tumorzellen nachgewiesen wurde [24, 25, 33, 61, 64]. Eine fehlende adaptive Antwort könnte sich dadurch erklären lassen, dass die Vorbestrahlung nicht in der richtigen Zellzyklusphase erfolgte. Eine Wirkung der niedrigen Strahlendosis wurde z.B. in Abhängigkeit von Bestrahlungszeitpunkt und aktueller Zellzyklusphase beschrieben [45, 66]. Wurden die Zellen in der G₁ – Phase vorbestrahlt und erfolgte die Hauptbestrahlung anschließend in der G₂ – oder S – Phase, so verlängerten sich diese Zellzyklusabschnitte und ein adaptiver Strahleneffekt konnte nachgewiesen werden. Eine AR nach Vorbestrahlung von Zellen in der G₀ – Phase blieb aus [45, 66].

Wie viele verschiedene Experimente zeigen, gibt es zudem eine hohe Variabilität hinsichtlich der Induzierbarkeit und dem Ausmaß einer adaptiven Antwort zwischen den Zelllinien von unterschiedlichen Spendern [64, 70].

Es wird vermutet, dass in Abhängigkeit von der Zellzyklusphase auch verschiedene Proteine [44, 87] und Gene [12, 39] in den Mechanismus der adaptiven Antwort involviert sind. Eine zentrale Rolle bei der Entfaltung der adaptiven Antwort spielt das p53 – Protein [12, 49, 72], sowie die Induktion der DNA – Reparatur und die Stressantwort.

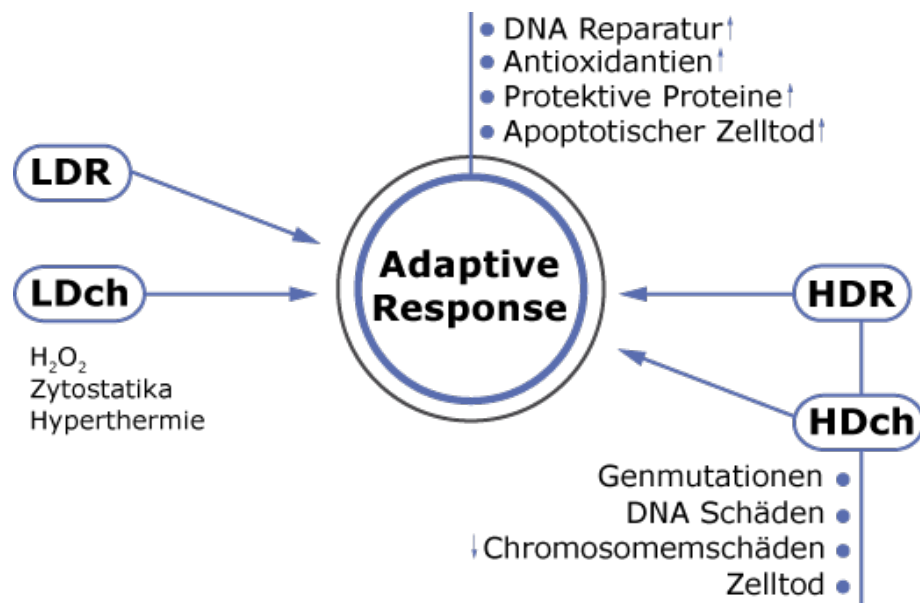


Abbildung 13: Illustration der adaptiven Antwort (AR) bei geringer Bestrahlungsdosis (low-dose radiation; LDR) oder Chemikalien geringer Konzentration (low-dose chemicals; LDch) und bei Hochdosisbestrahlung (high-dose radiation; HDR) oder Chemikalien hoher Konzentration (high-dose radiation; HDch) und die möglichen Mechanismen [10]

Die Schutzwirkung, die bei Applikation einer geringen Vorbestrahlungsdosis ausgelöst wird, kann darin begründet liegen, dass eine Aktivierung des Tumorsuppressorgens TP53 stattfindet. Okazaki et al. untersuchten den Effekt einer niedrigen Vorbestrahlungsdosis vor der Hochdosisbestrahlung auf dem Level des Apoptosevorgangs und der Expression von TP53 – Genen an Maussplenozyten. In TP53 positiven Mäusen war nach einer Bestrahlung mit Vor- und Hauptdosis die TP53 – Expression gesteigert und die Anzahl apoptotischer Zellen signifikant geringer als in TP53 Mäusen, die nur einer Hauptdosis von 2 Gy ausgesetzt waren. Das Fazit dieser Experimente ist, dass TP53 eine wichtige Rolle in der radioadaptiven Antwort spielt, indem bestrahlte Zellen durch Aktivierung intrazellulärer Reparatursysteme vor der Apoptose geschützt werden [34]. Auch andere Arbeiten verweisen auf die wichtige Rolle des p53 – Proteins sowohl bei der Kontrolle

des Zellzyklus als auch bei der DNA – Reparatur vermittelt über intrazelluläre Signaltransduktionswege [49, 74, 75].

In mehreren Experimenten konnte ein protektiver Effekt als Antwort auf Applikation von Oxidantien in subletalen Dosen demonstriert werden. Dazu gehören Wasserstoffperoxid – Moleküle und Superoxid – Radikale. Zellen haben gegenüber oxidativem Stress zwei Abwehrmechanismen: Prävention der Schadensentstehung und Reparatur der Schäden. Zum einen sind Antioxidantien, wie Superoxid – Dismutasen, Peroxidasen und Katalasen, direkt in die Prävention oxidativer Zellschäden involviert. Zum anderen erfolgt der Einsatz von Reparaturenzymen, wie DNA – Nukleasen und Glycosylasen [15]. Cortes et al. belegten, dass niedrige nicht toxische Dosen von Wasserstoffperoxid – Molekülen einen Schutz gegen strahleninduzierte Chromosomenschäden an menschlichen G₀ – Lymphozyten bieten [13]. Wasserstoff – Radikale, Hydroxyl – Radikale und Wasserstoffperoxid – Radikale können mit der DNA auf verschiedenen Wegen reagieren. Obwohl die DNA ein wichtiges biologisches Ziel für reaktiven Sauerstoff ist, reagieren Wasserstoff – Radikale alleine kaum mit der DNA. Erst mit Hilfe der Superoxid – Dismutase kommt es zu einer Reaktion bei der Wasserstoffperoxid entsteht [31].

Bei der Kombination der Wirkmechanismen von adaptiver Antwort und Photofrin II fällt auf, dass die Wirkung von Photofrin II von zytotoxischen Molekülen wie Hydroxyl– oder Peroxid – Radikalen abhängig ist. Bei der adaptiven Antwort konnte hingegen durch Versuche mit Superoxid – Dismutase (SOD) gezeigt werden, dass die adaptive Antwort unabhängig von Superoxid Radikalen ist [84]. Folglich könnten die beiden Modulatoren ohne gegenseitige Einschränkung die Zellfunktionen beeinflussen.

Die Verwendung von Photofrin II gehört bei der Photodynamischen Therapie bereits zum Standardverfahren. Da die Wirkung dieser Substanz auch im Zusammenhang mit ionisierender Strahlung verifiziert wurde, wäre es empfehlenswert, weitere klinische Studien zu diesem Radiosensitizer durchzuführen. Die adaptive Dosis gehört noch nicht zu den klinischen Verfahren, daher wären auf diesem Gebiet nicht nur weitere *in vitro*, sondern auch *in vivo* Versuche im Rahmen von klinischen Studien durchzuführen. Es liegen bereits *in vivo* Versuche an Mäusen vor [81].

Der Gedanke einer Kombination dieser beiden Effekte mit Modulation von verschiedenen Parametern wie Inkubationsdauer von Photofrin II, Veränderungen der Vorbestrahlungsdosis oder des Zeitintervalls zwischen Vor- und Hauptbestrahlung enthält Potential und sollte weiter verfolgt werden.

Zusammenfassend kann die Aussage getroffen werden, dass sowohl die Anwendung von Photofrin II als auch die adaptive Antwort nach Vorbestrahlung zwei Ansatzpunkte darstellen, die, jeder für sich, zur Effizienzsteigerung der Strahlentherapie beitragen könnten. Die Kombination aus diesen beiden zeigte in den *in vitro* Versuchen jedoch weder eine signifikante Effektsteigerung bei der Bestrahlung von Harnblasentumorzellen noch eine signifikante Reduktion der Strahlenwirkung an gesunden Zellen.

6 Zusammenfassung

Die Strahlentherapie ist ein etabliertes Verfahren bei der Behandlung von lokalen Tumoren. Je höher die Gesamtdosis der Strahlentherapie ist, desto wahrscheinlicher ist es, eine Tumorvernichtung zu erreichen. Dabei wird jedoch immer auch umgebendes gesundes Gewebe mit hohen Strahlendosen belastet. Die Toleranz des Normalgewebes stellt somit den limitierenden Faktor bei der applizierbaren Strahlendosis dar.

Das Ziel dieser Arbeit war es, zwei in der experimentellen und klinischen Strahlentherapie bekannte Effekte zu kombinieren, um herauszufinden, ob dies eventuell zu einer Therapieoptimierung führen könnte. Dazu wurde der Radiosensitizer Photofrin II als chemischer Modulator mit der adaptiven Antwort als biologischer Effekt kombiniert. Im idealen Fall könnte so eine Optimierung der Strahlentherapie sowohl durch eine gesteigerte Strahlenwirkung an Primärtumoren, als auch durch eine bessere Schonung des Normalgewebes erreicht werden. Dadurch könnte sich die Überlebenschancen tumorkranker Patienten verbessern [16].

Die Fragestellungen dieser Arbeit können wie folgt beantwortet werden:

1. Durch die Kombination aus dem chemischen Modulator Photofrin II und dem biologischen Effekt der adaptiven Antwort konnte ab einer Photofrin II - Konzentration von 5 µg/ml ein signifikant vermindertes Zellüberleben von RT4 – Zellen (Harnblasenkarzinomzellen) beobachtet werden. Jedoch war das Zellüberleben im Vergleich zu einer alleinigen Applikationsdosis von 2 Gy bei 5 µg/ml tendenziell und ab einer Applikationsdosis von 7,5 µg/ml signifikant höher.

2. Die Anwendung von Photofrin II und der adaptiven Dosis auf HCV29 – Zellen (gesundes Urothel) zeigte keine signifikante Erhöhung des Zellüberlebens, es ist allerdings eine entsprechende Tendenz zu erkennen. Ebenfalls fällt auf, dass bei einer Photofrin II – Konzentration von 2,5 µg/ml im Vergleich zur Bestrahlung ohne Photofrin II ein tendenziell erhöhtes Zellüberleben von HCV29 – Zellen festzustellen war. Jedoch ist dieser Effekt auch bei den RT4 – Zellen erkennbar.
3. RT4 – Zellen: Die kombinatorische Behandlung von RT4 – Zellen führte zu einem verminderten Zellüberleben. Im Vergleich zur Überlebensrate von Zellen, die nur mit einer Dosis von 2 Gy behandelt wurden, fiel dieser Unterschied im Zellüberleben jedoch geringer aus.
HCV29 – Zellen: Die kombinatorische Behandlung von HCV29 – Zellen führte zu einem erhöhten Zellüberleben, zeigte aber keinen signifikanten Unterschied zum Zellüberleben der Zellen, die nur mit 2 Gy bestrahlt wurden.
4. Die Ergebnisse zeigen, dass unter Verwendung beider Modulatoren, das Zellüberleben von Harnblasentumorzellen signifikant vermindert werden kann. Allerdings ist kein eindeutiger Vorteil aus dieser Kombination ersichtlich.
Das Zellüberleben der Blasenepithelzellen zeigt bei kombinatorischer Behandlung eine Tendenz zu einem gesteigerten Zellüberleben, aber auch hier ist kein klarer Nutzen aus der kombinatorischen Anwendung erkennbar.

Das Fazit dieser Arbeit ist, dass der alleinige Einsatz von Photofrin II als Radiosensitizer mit anschließender fraktionierter Bestrahlung ein erhöhtes Zellsterben von RT4 – Zellen bewirkt. Daher könnte es, übertragen auf den klinischen Einsatz, in der Behandlung von Harnblasenkarzinomen zukünftig ein wichtiges therapeutisches Konzept darstellen.

Die Anwendung einer adaptiven Dosis *in vitro* zum Schutz von Normalzellen, hier Blasenepithelzellen, zeigte im Ansatz eine vielversprechende Tendenz. Es müsste weiter geprüft werden, ob durch die adaptive Antwort auch bei klinischer Anwendung eine protektive Wirkung auf Normalgewebe erreicht werden könnte.

7 Literaturverzeichnis

- 1 Ahlering, T.E., Dubeau, L., Jones, P.A.: A new *in vivo* model to study invasion and metastasis of human bladder carcinoma, in Cancer Research, 1997, 47, S. 6660-6665
- 2 Bai, Y., Chen, D.: Accumulative effect of two doses of irradiation in inducing an adaptive response in human lymphocytes, in Mutation Research, 1993, Band 302, S. 191-196
- 3 Bauchinger, M., Schmid, E., Braselmann, H., Nahrstedt, U.: Absence of adaptive response to low-level irradiation from tritiated thymidine and X-rays in lymphocytes of two individuals examined in serial experiments, in Mutation Research, 1989, Band 227, S. 103-107
- 4 Bean, M.A., Pees, H., Fogh, J.E., Grabstald, H., Oettgen, H.F.: Cytotoxicity of lymphocytes from patients with cancer of the urinary bladder: detection by a ³Hproline microtoxicity test, in International Journal of Cancer, 1974, Band 14, S. 186-197
- 5 Bernhard, E.J., Mitchel, J.B., Deen, D.: Re-evaluating gadolinium (III) texaphyrin as a radiosensitizing agent, in Cancer Research, 2000, 60, S. 86-91
- 6 Boothman, D.A., Bouvard, I., Hughes, E.N.: Identification and Characterization of X-Ray-Induced Proteins in Human Cells, in Cancer Research, 1989, Band 49, S. 2871-2878

- 7 Bosi, A., Olivieri, G.: Variability of the adaptive response to ionizing radiations in humans, in *Mutation Research*, 1989, Band 211, S. 13-17
- 8 Byrne, C.J., Morshallsay, L.V., Wand, A.D.: The chemical composition of Photofrin, in *J Photochem Photobiol B*, 1990, 6, S. 13-27
- 9 Cai, L., Jiang, J., Wang, B.: Induction of an adaptive response to dominant lethality and to chromosome damage of mouse germ cells by low dose radiation, in *Mutation Research*, 1993, 303, S. 157-161
- 10 Cai, L.: Research of the adaptive response induced by low-dose radiation: where have we been and where should we go?, in *Human and Experimental Toxicology*, 1999, Band 18, S. 419-425
- 11 Cohen, L., Schwartz, S.: Modification of radiosensitivity by porphyrins II. Transplanted rhabdomyosarcoma in mice, in *Cancer Research*, 1966, 26, S. 1769-1773
- 12 Coleman, M.A., Yin, E., Peterson, L.E., Nelson, D., Sorensen, K.: Low-Dose Irradiation Alters the Transcript Profiles of Human Lymphoblastoid cells including genes associated with cytogenetic radioadaptive response, in *Radiation Research*, 2005, 164, S. 369-382
- 13 Cortés, F., Domínguez, I., Flores, M.J., Pinero, J., Mateos, J.C.: Differences in the adaptive response to radiation damage in G0 human lymphocytes conditioned with

hydrogen peroxide or low-dose X-rays, in Mutation Research, 1994, Band 311, S. 157-163

- 14 Cramers, P., Atanasova, P., Vrolijk, H.: Pre-exposure to low doses: modulation of X-ray-induced DNA damage and repair?, in Radiation Research, 2005, 164, S. 383-390
- 15 Crawford, D.R., Davies, K.J.A.: Adaptive Response and Oxidative Stress, in Environ Health Prospect, 1994, Band 102 (10), S. 25-28
- 16 Herrmann, Th., Baumann, M., Dörr, W.: Klinische Strahlenbiologie, Urban & Fischer Verlag, 2006, 4. Auflage
- 17 Elmore, E., Lao, X.Y., Kapadia, R.: Low dose of very low-dose-rate low-LET radiation suppress radiation-induced neoplastic transformation in vitro and induce an adaptive response, in Radiation Research, 2008, 169, S. 311-318
- 18 Fan, S., Vijayalaxmi, Mindek, G., Burkart, W.: Adaptive response to 2 low doses of X-rays in human blood lymphocytes, in Mutation Research, 1990, Band 243, S. 53-56
- 19 Fickweiler, S., Steinbach, P., Wörle, K., Hofstädter, F.: The Combined Effects of High-Energy Shock Waves and Ionising Radiation on a Human Bladder Cancer Cell Line, in Ultrasound in Medicine and Biology, 1996, Band 22, S. 1097-1102
- 20 Hahn, S.M., Putt, M.E., Metz, J., Shin, D.B., Rickter, E., Menon, C., Smith, D., Glatstein, E., Fraker, D.L., Busch,

- T.M.: Photofrin Uptake in the Tumor and Normal Tissues of Patients Receiving Intraperitoneal Photodynamic Therapy, in Clin Cancer Res, 2006, Band 12 (18), S. 5464-5470
- 21 Ikushima, T.: Radio-adaptive response: characterization of a cytogenetic repair induced by low-level ionizing radiation in cultured Chinese hamster cells, in Mutation Research, 1989, Band 227, S. 241-246
 - 22 Ikushima, T.: Radioadaptive response: responses to the five questions, in Human and Experimental Toxicology, 1999, Band 18, S. 433-435
 - 23 Ikushima, T., Aritomi, H., Morisita, J.: Radioadaptive response: Efficient repair of radiation-induced DNA damage in adapted cells, in Mutation Research, 1996, Band 358, S. 193-198
 - 24 Jiang, H., Xu, Y., Ma, K.: Low-dose radiation does not induce proliferation in tumor cells in vitro and in vivo, in Radiation Research, 2008, 170, S. 477-487
 - 25 Jiang, H., Li, W., Li, X.: Low-dose radiation induces adaptive response in normal cells, but not in Tumor cells: in vitro and in vivo studies, in Journal of Radiation Research, 2008
 - 26 Jori, G.: Tumour photosensitizers: approaches to enhance the selectivity and efficiency of photodynamic therapy, in J Photochem Photobiol B: Biol, 1996, Band 36, S. 87-93
 - 27 Kauffmann, G.W., Moser, E., Sauer, R.: Radiologie, Urban & Schwarzenberg, 1996

- 28 Kulka, U., Schaffer, M., Schaffer, P.M., Ertl-Wagner, B., Jori, G., Dühmke, E., Hofstetter, A.: Photofrin as an efficient radiosensitizer in an in vitro cell survival assay, in Biochemical & Biophysical Research Communication, 2003, Band 311, S. 98-103
- 29 Luksiene, Z., Juzenas, P., Moan, J.: Radiosensitization of tumours by porphyrins, in Cancer Letters, 2006, 235, S. 40-47
- 30 Masters, J.R.W., Hepburn, P.J., Walker, L., Highman, W.J., Trejdosiewicz, L.K., Povey, S., Parkar, M., Hill, B.T., Riddle, P.R., Franks, L.M.: Tissue Culture Model of Transitional Cell Carcinoma: Characterization of Twenty-two Human Urothelial Cell Lines, in Cancer Research, 1986, Band 46, S. 3630-3636
- 31 Matsumoto, H., Hamada, N., Takahashi, A.: Vanguard of Paradigm Shift in Radiation Biology: Radiation-induced adaptive and bystander responses, in J. Radiat. Res., 2007, 48, S. 97-106
- 32 McBride, W.H., Withers, H.R.: Biologic basis of radiation therapy, in Principles and Practice of Radiation Oncology, Perez CA and Brady LW (Eds.), Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, 2004, S. 96-136
- 33 Miyamoto, A., Shibamoto, Y., Sugie, Ch.: Absence of radioadaptive responses in four cell-lines in vitro as determined by colony formation assay, in Kurume Medical Journal, 2006, 53, S. 1-5

- 34 Okazaki, R., Ootsuyama, A., Norimura, T.: TP53 and TP53-related genes associated with protection from apoptosis in the radioadaptive response, in Radiation Research, 2007, 167, S. 51-57
- 35 Olivieri, G., Bodycote, J., Wolff, S.: Adaptive Response of Human Lymphocytes to Low Concentrations of Radioactive Thymidine, in Science, 1984, Band 223, S. 594-597
- 36 Prasad, A.V., Mohan, N., Chandraseker, B.: Induction of transcription of "immediate early genes" by low-dose ionizing radiation, in Radiation Research, 1995, 143 (3), S. 263-272
- 37 Petrovich, Z., Jozsef, G., Brady, L.W.: Radiotherapy for Carcinoma of the Bladder, in Am J Clin Oncol (CCT), 2001, 24(1), S. 1-9
- 38 Raaphorst, G.P., Boyden, S.: Adaptive response and its variation in human normal and tumour cells, in International Journal of Radiation Biology, 1999, Band 75, S. 865-873
- 39 Rigaud, O., Moustacchi, E.: Radioadaptation for gene mutation and the possible molecular mechanisms of the adaptive response, in Mutation Research, 1996, Band 358, S. 127-134
- 40 Robert Koch Institut: Krebs in Deutschland 2005/2006, Häufigkeiten und Trends, 6. überarbeitete Auflage, 2010
[http://www.rki.de/cln_160/nn_205770/DE/Content/GBE/Gesundheitsberichterstattung/GBEDownloadsB/KID2010,templateId=raw,property=publicationFile.pdf/KID2010.pdf]

- 41 Robson, T., Joiner, M.C., Wilson, G.D.: A novel human stress response-related gene with a potential role in induced radioresistance, in *Radiation Research*, 1999, 152 (5), S. 451-461
- 42 Ruiz de Almodóvar, J.M., Bush, C., Peacock, J.H., Steel, G.G., Whitaker, S.J., McMillan, T.J.: Dose-Rate Effect for DNA Damage Induced by Ionizing Radiation in Human Tumor Cells, in *Radiation Research*, 1994, Band 138, S. 93-96
- 43 Saczko, J., Mazurkiewicz, M., Chwilkowska, A.: Intracellular distribution of Photofrin II in Malignant and normal endothelial Cell lines, in *Folia Biologica*, 2007, 53, S. 7-12
- 44 Sadekova, S., Lehnert, S., Chow, T.Y.-K.: Induction of PBP74/mortalin/Grp75, a member of the hsp70 family, by low doses of ionizing radiation: a possible role in induced radioresistance, in *International Journal of Radiation Biology*, 1997, Band 72, S. 653-660
- 45 Salone, B., Grillo, R., Aillaud, M., Bosi, A., Olivieri, G.: Effects of low-dose (2cGy) X-ray on cell-cycle kinetics and on induced mitotic delay in human lymphocyte, in *Mutation Research*, 1996, Band 351, S. 193-197
- 46 Samson, L., Cairns, J.: A new pathway for DNA repair in *Escherichia coli*, in *Nature*, 1977, Band 267, S. 281-282
- 47 Samson, L., Schwartz, J.L.: Evidence for an adaptive DNA repair pathway in CHO and human skin fibroblast cell lines, in *Nature*, 1980, Band 287, S. 861-863

- 48 Sankaranarayanan, K., v. Duyn, A., Loos, M.J., Natarajan, A.T.: Adaptive response of human lymphocytes to low-level radiation from radioisotopes or X-rays, in Mutation Research, 1989, Band 211, S. 7-12
- 49 Sasaki, M.S., Ejima, Y., Tachibana, A., Yamada, T., Ishizaki, K., Shimizu, T., Nomura, T.: DNA damage response pathway in radioadaptive response, in Mutation Research, 2002, Band 504, S. 101-118
- 50 Sauer, R.: Strahlentherapie und Onkologie, Urban & Fischer, 4. Auflage, 2003
- 51 Schaffer, M., Schaffer, P.M., Corti, L., Sotti, G., Hofstetter, A., Jori, G., Dühmke, E.: Photofrin II as an efficient radiosensitising agent in an experimental tumour, in Onkologie, 2001a, Band 24, S. 482-485
- 52 Schaffer, M., Schaffer, P.M., Jori, G., Corti, L., Sotti, G., Hofstetter, A., Dühmke, E.: Radiation Therapy combined with Photofrin or 5-ALA - effect on Lewis Sarcoma Tumor lines implanted on mice-preliminary results, in Tumori 2002a, Band 88, S. 408-411
- 53 Schaffer, M., Schaffer, P.M., Hofstetter, A., Dühmke, E., Jori, G.: On the double role of photofrin as a photo-and a radiosensitising agent: a possible new combination therapy for tumours, in Photochemical & Phobiological Science, 2002c, Band 1, S. 438-439
- 54 Schaffer, M., Schaffer, P.M., Vogesser, M., Ertl-Wagner, B., Rauch, J., Oberneder, R., Jori, G., Hofstetter, A., Dühmke,

- E.: The application of Photofrin II as a specific radiosensitizing agent, in patients with bladder - cancer, report of two cases, in Photochemical & Photobiological, 2002d, Science, Band 1, S. 686-689
- 55 Schaffer, M., Schaffer, P.M., Corti, L., Gardiman, M., Sotti, G., Hofstetter, A., Jori, G., Dühmke, E.: Photofrin as a specific radiosensitising agent for tumors: studies in comparison to other porphyrins, in an experimental in vivo model, in J Photochem Photobiol B:Bio, 2002b, Band 66, S. 157-64
 - 56 Schaffer, M., Ertl-Wagner, B., Schaffer, P.M., Kulka, U., Hofstetter, A., Dühmke, E., Jori, G.: Porphyrins as radiosensitizing agents for solid neoplasms, in Current Pharmaceutical Design, 2003, Band 9 (25), S. 2024-2035
 - 57 Schaffer, M., Kulka, U., Ertl-Wagner, B., Schaffer, P.M., Jori, G., Friso, E., Hell, R., Hofstetter, A., Dühmke, E.: Effect of Photofrin II as a radiosensitizing agent in two different oesophageal carcinomacell lines, in The Journal of Porphyrins and Phthalocyanines, 2005, Band 9, S. 470-475
 - 58 Schaffer, M., Ertl-Wagner, B., Schaffer, P.M., Kulka, U., Jori, G., Dühmke, E., Hofstetter, A.: The application of Photofrin II as a sensitizing agent for ionizing radiation- a new approach in tumour therapy?, in Current Medicinal Chemistry, 2005a, Band 12, S. 763-771
 - 59 Schaffer, M., Ertl-Wagner, B., Schaffer, P.M., Kulka, U., Jori, G., Wilkowski, R., Hofstetter, A., Dühmke, E.: Feasibility of Photofrin II as a Radiosensitizing Agent in Solid Tumors –

Preliminary Results, in *Onkologie*, 2006, Band 29, S. 514-519

- 60 Schaffer, P.M., Kulka, U., Ertl-Wagner, B.: The influence of oxygen on the radiosensitizing activity of Photofrin II and Hypericin, in *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, 2007, 11, S. 1-6
- 61 Schaffer, M., Schwarz, S.B., Kulka, U.: Adaptive doses of irradiation-an approach to a new therapy concept for bladder cancer?, in *Radiat Environ Biophys*, 2004, 43, S. 271-276
- 62 Schaffer, M., Kulka, U., Schaffer, P.M.: The role of radical derivatives of high reactivity in the radiosensitizing action of Photofrin II, in *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, 2006, 10, S. 1398-1402
- 63 Schmid, E., Bauchinger, M., Nahrstedt, U.: Adaptive response after X-irradiation of human lymphocytes? , in *Mutagenesis*, 1989, Band 4, S. 87-89
- 64 Schwarz, S.B., Schaffer, P.M., Kulka, U.: The effect of radio-adaptive doses on HT29 and GM637 cells, in *Radiation Oncology*, 2008, 3, S. 12-
- 65 Shadley, J.D.: Chromosomal Adaptive Response in Human Lymphocytes, in *Radiation Research*, 1994, Band 138, S. 9-12
- 66 Shadley, J.D., Afzal, V., Wolff, S.: Characterization of the Adaptive Response to Ionizing Radiation Induced by Low

Doses of X Rays to Human Lymphocytes, in Radiation Research, 1987, Band 111, S. 511-517

- 67 Shadley, J.D., Dai, G.: Cytogenetic and survival adaptive responses in G1 phase human lymphocytes, in Mutation Research, 1992, Band 265, S. 273-281
- 68 Shadley, J.D., Wiencke, J.K.: Induction of the adaptive response by X-rays is dependent on radiation intensity, in International Journal of Radiation Biology, 1989, Band 56, S. 107-118
- 69 Shadley, J.D., Wolff, S.: Very low doses of X-rays can cause human lymphocytes to become less susceptible to ionising radiation, in Mutagenesis, 1987, Band 2, S. 95-96
- 70 Sorensen, K.J., Attix, C.M., Christian, A.T., Wyrobek, A.J., Tucker, J.D.: Adaptive response induction and variation in human lymphoblastoid cell lines, in Mutation Research, 2002, Band 519, S. 15-24
- 71 Sökeland, J., Schulze, H., Rübben, H.: Urologie, Thieme Verlag, 2004, 13. Auflage
- 72 Stecca, C., Gerber, G.B.: Adaptive Response to DNA-Damaging Agents A Review of Potential Mechanisms, in Biochemical Pharmacology, 1998, Band 55, S. 941-951
- 73 Szumiel, I.: Monitoring and Signaling of Radiation-Induced Damage in Mammalian Cells, in Radiation Research, 1998, Band 138 (Suppl.), S. 92-101

- 74 Takahashi, A., Asakawa, I., Yuki, K.: Radiation-induced apoptosis in the scid mouse spleen after low dose-rate irradiation, in *Int. J. Radiat. Biol.*, 2002, 78 (8), S. 689-693
- 75 Takahashi, A., Kondo, N., Inaba, H.: Radiation-induced apoptosis in scid mice spleen after low dose irradiation, in *Adv. Space Res.*, 2003, 31 (6), S. 1569-1573
- 76 Tapio, S., Jacob, V.: Radioadaptive response revisited, in *Radiat Environ Biophys*, 2007, 46, S. 1-12
- 77 Ueno, A.M., Vannais, D.B., Gustafson, D.L., Wong, J.C., Waldren, C.A.: A low, adaptive dose of gamma-rays reduced the number and altered the spectrum of S1- mutants in human-hamster hybrid AL cells, in *Mutation Research*, 1996, Band 358, S. 161-169
- 78 Venkat, S., Apte, S.K., Chaubey, R.C., Chauhan, P.S.: Radioadaptive Response in Human Lymphocytes in vitro, in *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*, 2001, Band 20, S. 165-175
- 79 Wang, B., Ohyama, H., Haginoya, K., Odaka, T., Itsukaichi, H., Yukawa, O., Yamada, T., Hayata, I.: Adaptive Response in Embryogenesis. V. Existence of Two Efficient Dose-Rate Ranges for 0,3Gy of Priming Irradiation to Adapt Mouse Fetuses, in *Radiation Research*, 2004, Band 161, S. 264-272
- 80 Wassermann, T.H., Chapman, J.D.: Radiation Response Modulation, in *Principles and Practice of Radiation Oncology*, Perez CA and Brady LW (Eds.), Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, 2004, S. 663-679

- 81 Wojcik, A., Tuschl, H.: Indications of an adaptive response in C57BL mice pre-exposed in vivo to low doses of ionizing radiation, in *Mutation Research*, 1990, Band 243, S. 67-73
- 82 Wojewodzka, M., Walicka, M., Sochanowicz, B., Szumiel, I.: Calcium antagonist, TMB-8, prevents the induction of adaptive response by hydrogen peroxide or X-rays in human lymphocytes, in *International Journal of Radiation Biology*, 1994, Band 66, S. 99-109
- 83 Wolff, S.: Adaptation to Ionizing Radiation Induced by Prior Exposure to Very Low Doses, in *Chinese Medical Journal*, 1994, Band 107, S. 425-430
- 84 Wolff, S.: Aspects of the adaptive response to very low doses of radiation and other agents, in *Mutation Research*, 1996, Band 358, S. 135-142
- 85 Wolff, S.: The Adaptive Response in Radiobiology: Evolving Insights and Implications, in *Environmental Health Perspectives*, 1998, Band 106, S. 277-283
- 86 Young, S.W., Qing, F., Harriman, A.: Gadolinium (III) texaphyrin: A tumor selective radiation sensitizer that is detectable by MRI, in *Proc Nat Acad Sci USA*, 1996, 93, S. 6610-6615
- 87 Youngbloom, J.H., Wiencke, J.K., Wolff, S.: Inhibition of the adaptive response of human lymphocytes to very low doses of ionising radiation by the protein synthesis inhibitor cycloheximide, in *Mutation Research*, 1989, Band 227, S. 257-261

8 **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Zeitlicher Verlauf der biologischen Strahlenwirkung [27]	11
Abbildung 2: Dosis – Effekt – Kurve nach fraktionierter Bestrahlung (D1 – D4) einer Zellkultur. Kurve A entspricht der Überlebenskurve nach einer Einzeldosisbestrahlung, B – E den Überlebenskurven nach fraktionierter Bestrahlung [50]	12
Abbildung 3: Prinzip der Dosisfraktionierung [50]	14
Abbildung 4: Prozess der Reoxygenierung [50]	15
Abbildung 5: Strukturformel von Dihämatoporphyrinester (Photofrin II) [Stepp 1993]	18
Abbildung 6: Originaltumorzellen des Harnblasenkarzinoms [30]	29
Abbildung 7: Beschriftung und Verteilung der Versuchslösungen auf eine 96 - well - plate	33
Abbildung 8: Verteilungs- und Beschriftungsschema einer 96 - Kammer -Schale nach Zugabe von Photofrin II	34
Abbildung 9: Versuchsaufbau zur Vorbestrahlung (zu Abbildungszwecken hier mit Licht)	37
Abbildung 10: Versuchsaufbau zur Hauptbestrahlung (zu Abbildungszwecken hier mit Licht)	38
Abbildung 11: Detailansicht des Versuchsaufbaus zur Hauptbestrahlung	39
Abbildung 12: Spaltung des Tetrazolium Salzes WST - 1 (hellrot) zu Formazan (dunkelrot)	43

Abbildung 13: Illustration der adaptiven Antwort (AR) bei geringer Bestrahlungsdosis (low-dose radiation; LDR) oder Chemikalien geringer Konzentration (low-dose chemicals; LDch) und bei Hochdosisbestrahlung (high-dose radiation; HDR) oder Chemikalien hoher Konzentration (high-dose radiation; HDch) und die möglichen Mechanismen [10]

68

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Beispiele für zeitliche Dosisverteilungen bei unterschiedlichen Fraktionierungsarten. Einzeldosis (ED), Gesamtdosis (GD), Anzahl der täglichen und wöchentlichen Bestrahlungen [16] 13

Tabelle 2: Einfluss verschiedener Photofrin II – Konzentrationen auf das Zellüberleben von RT4 – Zellen ohne Bestrahlung; *statistisch signifikant 47

Tabelle 3: Einfluss verschiedener Photofrin II – Konzentrationen auf das Zellüberleben von RT4 – Zellen bei 0,05 Gy; *statistisch signifikant 48

Tabelle 4: Einfluss verschiedener Photofrin II – Konzentrationen auf das Zellüberleben von RT4 – Zellen bei 2 Gy Bestrahlungsdosis; *statistisch signifikant 49

Tabelle 5: Einfluss verschiedener Photofrin II – Konzentrationen auf das Zellüberleben von RT4 – Zellen bei Bestrahlung mit 0,05 Gy + 2 Gy; 50

Tabelle 6: Einfluss der Vorbestrahlung (0,05 Gy) im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung mit 2 Gy bei unterschiedlichen Photofrin II – Konzentrationen; *statistisch signifikant 52

Tabelle 7: Einfluss verschiedener Photofrin II – Konzentrationen auf das Zellüberleben von HCV29 – Zellen ohne Bestrahlung; *statistisch signifikant 54

Tabelle 8: Einfluss verschiedener Photofrin II – Konzentrationen auf das Zellüberleben von HCV29 – Zellen bei 0,05 Gy; *statistisch signifikant 55

Tabelle 9: Einfluss verschiedener Photofrin II – Konzentrationen auf das Zellüberleben von HCV29 – Zellen bei 2 Gy Bestrahlungsdosis; *statistisch signifikant 56

Tabelle 10: Einfluss verschiedener Photofrin II – Konzentrationen auf das Zellüberleben von HCV29 – Zellen bei 0,05 Gy + 2 Gy; *statistisch signifikant 57

Tabelle 11: Einfluss der Vorbestrahlung (0,05 Gy) im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung mit 2 Gy bei unterschiedlichen Photofrin II – Konzentrationen 59

10 Danksagung

Während der Experimentier-, Auswertungs- und Schreibzeit meiner Doktorarbeit erfuhr ich von zahlreichen Personen Unterstützung. Stellvertretend für viele möchte ich mich bei einigen ganz besonders bedanken.

Mein großer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn PD Dr. Dr. med. Moshe Schaffer für die Bereitstellung des interessanten Themas und für die fachliche Betreuung meiner Arbeit. Mit seinen Kommentaren und seinem entgegengebrachten Vertrauen trug er zum Gelingen der Doktorarbeit bei.

Besonders bedanken möchte ich mich bei der Strahlenbiologin Frau Dr. rer. nat. Ulrike Kulka für die Betreuung meiner Arbeit. Mit ihrer Hilfe, der konstruktiven Kritik und den hilfreichen Korrekturvorschlägen konnte meine Doktorarbeit erfolgreich abgeschlossen werden. Ohne ihre Erfahrung und ihr fundiertes Fachwissen wäre das Projekt in dieser Form nicht möglich gewesen. Sie unterstützte mich mit ihrer lebenswürdigen und freundlichen Art nicht nur mit Rat und Tat bei fachlichen Fragen, sondern mit Zuspruch bei jeglichen Schwierigkeiten.

Abschließend möchte ich mich ganz herzlich bei meinen Eltern für ihre Geduld und liebevolle Unterstützung in allen Höhen und Tiefen bedanken. Ohne ihren Beitrag wären das Studium und diese Arbeit nicht möglich gewesen.